

**Enzyme und Reaktionswege zur Abwehr reaktiver  
Sauerstoffspezies in *Clostridium acetobutylicum***

**Dissertation**

zur

Erlangung des akademischen Grades

*doctor rerum naturalium*

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

**Oliver Riebe**

aus Schwerin

geb. am 28. 02. 1980 in Hagenow

Rostock, Januar 2009

urn:nbn:de:gbv:28-diss2009-0115-4

Gutachter: Prof. Dr. Hubert Bahl, Universität Rostock  
Prof. Dr. Michael Hecker, Universität Greifswald  
Prof. Dr. Ulrike Gerischer, MPI für biophysikalische Chemie Göttingen

Wissenschaftliches Kolloquium: 27.04.2009

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

VII

<b><u>1</u></b>	<b><u>Einleitung</u></b>	<b>1</b>
1.1	Entgiftungsmechanismen aerober Mikroorganismen	3
1.2	Entgiftungsmechanismen in Anaerobiern	4
1.3	Redoxenzyme zur Verteidigung gegen ROS	5
1.4	Sauerstoff und Clostridien	8
1.5	Ziele der vorliegenden Arbeit	10
<b><u>2</u></b>	<b><u>Material und Methoden</u></b>	<b>11</b>
2.1	Organismen und Plasmide	11
2.2	Nährmedien	12
2.2.1	Medien für <i>C. acetobutylicum</i>	12
2.2.2	Medium für <i>E. coli</i>	14
2.3	Medienzusätze	14
2.4	Stammhaltung	15
2.5	Batch-Kulturen	15
2.6	Anaerobe Anzucht von <i>C. acetobutylicum</i> auf Festmedium	15
2.7	Bestimmung der physiologischen Parameter	16
2.7.1	Messung der optischen Dichte	16
2.7.2	Gaschromatographie	16
2.7.2.1	Probenvorbereitung	16
2.7.2.2	Quantifizierung	16
2.7.2.3	Analysebedingungen	17
2.8	Nukleinsäure Standardtechniken	17
2.8.1	Vorbehandlung von Geräten und Lösungen	17
2.8.2	Puffer und Lösungen	17
2.8.3	Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	18
2.8.3.1	Phenol-Chloroform-Extraktion	18
2.8.3.2	Isopropanolfällung	18
2.8.3.3	Natriumacetat-Ethanol-fällung	19
2.8.3.4	Ammoniumacetat- Ethanol-fällung	19

<b>2.8.4</b>	<b>Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle</b>	<b>19</b>
2.8.4.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle	19
2.8.4.2	Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle im Agarosegel	19
<b>2.8.5</b>	<b>Agarosegelelektrophorese</b>	<b>20</b>
2.8.5.1	Standard-Agarosegelelektrophorese	20
2.8.5.2	Nukleinsäure-Längenstandards	20
<b>2.8.6</b>	<b>Isolierung von Nukleinsäuren</b>	<b>21</b>
2.8.6.1	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>C. acetobutylicum</i>	21
2.8.6.2	Plasmid-Mini-Präparation aus <i>E.coli</i>	22
<b>2.8.7</b>	<b>Enzymatische Modifikationen von DNA</b>	<b>24</b>
2.8.7.1	Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	24
2.8.7.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	24
2.8.7.3	Ligation von DNA-Fragmenten	25
<b>2.8.8</b>	<b><i>In vitro</i>-Amplifikation von DNA mittels PCR</b>	<b>25</b>
2.8.8.1	Standard-Reaktionsbedingungen	25
2.8.8.2	Aufreinigung der PCR-Amplifikate	26
<b>2.8.9</b>	<b>DNA-Sequenzierung</b>	<b>27</b>
<b>2.8.10</b>	<b>Southern-Blot</b>	<b>27</b>
2.8.10.1	DNA-Markierung	27
2.8.10.2	Übertragung von Nukleinsäuren auf Membranen	28
2.8.10.3	Hybridisierung	29
2.8.10.4	Detektion Digoxigenin-markierter DNA	30
<b>2.9</b>	<b>Transformation von <i>E. coli</i></b>	<b>31</b>
2.9.1	Herstellung CaCl <sub>2</sub> -kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	31
2.9.2	Hitzeschock-Transformation CaCl <sub>2</sub> -kompetenter <i>E. coli</i>	32
2.9.3	Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation	33
<b>2.10</b>	<b>Transformation von <i>C. acetobutylicum</i> durch Elektroporation</b>	<b>33</b>
<b>2.11</b>	<b>Polyacrylamidgelelektrophorese</b>	<b>34</b>
2.11.1	SDS-PAGE	34
2.11.2	Native PAGE	36
<b>2.12</b>	<b>Proteinfärbung mit colloidalem Coomassie</b>	<b>36</b>



<b>2.13</b>	<b>Zielgerichtete Mutagenese von <i>C. acetobutylicum</i> mittels „ClosTron System“</b>	<b>37</b>
2.13.1	Auswahl von Insertionsorten	38
2.13.2	Splicing by overlap extension (SOE) PCR	38
2.13.3	Integration des Gruppe-II-Introns	39
<b>2.14</b>	<b>Zellernte und Zellaufschluss</b>	<b>40</b>
2.14.1	Schneller Aufschluss für die SDS-PAGE	40
2.14.2	Herstellung geklärter Lysate für <i>Strep</i> -Tactin-Sepharose	40
<b>2.15</b>	<b>Protein-Standardmethoden</b>	<b>41</b>
2.15.1	Affinitätschromatographie an <i>Strep</i> -Tactin-Sepharose	41
2.15.2	Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford	42
2.15.3	Spektrometrische Charakterisierung von Protein	42
2.15.4	Größenbestimmung von Proteinen mittels FPLC	43
2.15.5	Transfer von Proteinen auf Membranen (Western-Blot)	43
2.15.6	ST-AP-Detektion von <i>Strep</i> -TagII-Fusionsproteinen	44
<b>2.16</b>	<b>Messung von Sauerstoffverbrauch in <i>C. acetobutylicum</i> Kulturen oder Proteingemischen</b>	<b>45</b>
<b>2.17</b>	<b>Enzymassays</b>	<b>46</b>
2.17.1	Superoxid-Dismutase Zymogramm	46
2.17.2	Optisch-enzymatische ( <i>in vitro</i> ) Tests	47
2.17.2.1	NBT Test zum Nachweis von SOD-Aktivität	47
2.17.2.2	Nachweis von SOD/SOR-Aktivität mit Cytochrom C	47
2.17.2.3	Nachweis des NAD(P)H-Verbrauchs verschiedener Reaktionen	48
2.17.2.4	Nachweis von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konsum/Bildung	49
2.17.3	Messung der O <sub>2</sub> - und H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Toleranz verschiedener <i>C. acetobutylicum</i> Stämme ( <i>in vivo</i> )	50
<b>2.18</b>	<b>Bezugsquellen</b>	<b>50</b>
<b>3</b>	<b><u>Experimente und Ergebnisse</u></b>	<b>53</b>
<b>3.1</b>	<b>Klonierung von <i>rd</i>, <i>dfx</i>, <i>nrer</i>, <i>rubY</i> und <i>revrbr</i></b>	<b>53</b>
3.1.1	Auswahl der Expressionssysteme	53
3.1.1.1	IBA-Vektoren	54
3.1.1.2	pT-Vektor	54

3.1.2	Amplifikation der Gene	55
3.1.3	Restriktion der Amplifikate	57
3.1.4	Ligation in verschiedene Vektorsysteme	57
3.2	<b>Heterologe Expression</b>	59
3.2.1	Heterologe Expression mittels pI-Vektoren	59
3.2.2	Heterologe Expression mittels pT-Vektor	60
3.2.3	Größenbestimmung von Proteinkomplexen mittels FPLC	61
3.2.4	Interaktionsstudien	63
3.2.5	Spektren der verschiedenen Proteine und deren Beeinflussung durch Oxidation/Reduktion	64
3.2.6	Nachweis von Proteinen mittels Western-Blot	65
3.3	<b>Untersuchung der Enzymaktivität von Desulfoferrodoxin</b>	67
3.3.1	Superoxid-Dismutase Aktivität von <i>C. acetobutylicum</i> Dfx	67
3.3.2	Superoxid-Reduktase Aktivität von <i>C. acetobutylicum</i> Dfx	68
3.3.2.1	Cytochrom C abhängige SOR-Aktivität von Dfx	68
3.3.2.2	Rd/NROR-abhängige SOR-Aktivität von <i>C. acetobutylicum</i> Dfx	69
3.3.2.2.1	NROR/Rd/Dfx-abhängiger NAD(P)H-Verbrauch	69
3.3.2.2.2	NROR/Rd/Dfx-abhängige H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bildung	71
3.4	<b>Untersuchung der Enzymaktivität von reversem Rubrerythrin</b>	72
3.4.1	Superoxid-Dismutase Aktivität von revRbr	72
3.4.2	NAD(P)H-Peroxidase/Oxidase Aktivitäten von <i>C. acetobutylicum</i> revRbr	73
3.4.2.1	Messung des NAD(P)H-Verbrauchs	74
3.4.2.2	Messung des H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Verbrauchs	77
3.4.2.3	Messung des Sauerstoffverbrauchs infolge der NADH-Oxidase Aktivität des revRbr	78
3.4.3	NADH-Peroxidase und NADH-Oxidase Aktivität von <i>C. acetobutylicum</i> RubY	79
3.5	<b>Insertionsmutagenese von <i>C. acetobutylicum</i> mittels ClosTron-System</b>	80
3.5.1	Festlegung der Insertionsorte	80
3.5.2	Modifikation des Ll.LtrB-Introns und Ligation in pMTL007	80

3.5.3	Identifizierung von <i>C. acetobutylicum</i> Mutanten	82
3.5.3.1	PCR-screening	82
3.5.3.2	Integrationsnachweis mittels Southern-Blot	85
3.6	<b>Charakterisierung rekombinanter <i>C. acetobutylicum</i> Stämme</b>	86
3.6.1	Morphologische Charakterisierung der <i>C. acetobutylicum</i> Stämme	86
3.6.2	Wachstumsphysiologische Experimente	87
3.6.2.1	Wachstum im Komplexmedium (CGM)	88
3.6.2.2	Wachstum im Minimalmedium (MS-Mes)	89
3.6.3	Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs von Zellkulturen	92
3.6.4	Stress-Toleranz	93
3.6.4.1	Überleben nach O <sub>2</sub> -Stress	93
3.6.4.2	Überleben nach H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Stress	95
3.6.5	Veränderungen im Produktspektrum durch Mutationen und oxidativen Stress	96
<b>4</b>	<b><u>Diskussion</u></b>	<b>101</b>
4.1	Aufreinigung der verschiedenen Proteine	101
4.2	Proteinfunktionen	105
4.2.1	Funktionen von Desulfoferrodoxin	105
4.2.2	Funktionen von revRbr	109
4.2.3	Elektronenübertragung	113
4.3	Stresstoleranz verschiedener <i>C. acetobutylicum</i> Stämme	116
4.3.1	Verteidigung gegen oxidativen Stress	116
4.3.2	Eingriff in die Elektronenübertragung	119
4.3.3	Manipulationen der endständigen Proteine	120
4.4	Beeinflussung des Stoffwechsels von <i>C. acetobutylicum</i> durch oxidativen Stress	121
<b>5</b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b>	<b>127</b>
<b>6</b>	<b><u>Literaturverzeichnis</u></b>	<b>130</b>

<b><u>7</u>    <u>Anhang</u></b>	<b>138</b>
Danksagung	146
Publikationsliste	147
Selbständigkeitserklärung	149

## Abkürzungen

A	Adenin, Ampere, Absorption	M.	<i>Methanoanaerobacterium</i>
Abb.	Abbildung	μ	mikro (10 <sup>-6</sup> ), Wachstumsrate
Ac	Acetat	MOPS	3-(N-Morpholino)- Propansulfonsäure
ad	auffüllen auf	MS	Medium Synthetique
ADP	Adenosin-5`-diphosphat	MW	Molekulargewicht (,molecular weight')
Amp	Ampicillin	n	nano (10 <sup>-9</sup> ), Anzahl
AP	alkalische Phosphatase	N	Stickstoff, Normal
Ap	Ampicillin	N-	Amino-
APS	Ammoniumpersulfat	NAD(P) <sup>+</sup>	Nicotinamadenindinucleotid- (phosphat)
AR	Amplex Red (10-Acetyl-3,7- Dihydroxyphenoxazin)	NAD(P)H	Nicotinamadenindinucleotid- (phosphat), reduziert
AS	Aminosäure(n)	NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
ATCC	American Type Culture Collection	NROR	NADH:Rubredoxin Oxidoreduktase
ATP	Adenosin-5`-triphosphat	o.	oder
B	Base	OD	optische Dichte
B.	<i>Bacillus</i>	oE	ohne EDTA
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- phosphat	ORF	offener Leserahmen (,open reading frame')
Bp	Basenpaar	ox.	oxidiert
BSA	Rinderserumalbumin	P.	<i>Porphyromonas</i> , <i>Pyrococcus</i>
bzw.	beziehungsweise	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
C	Cytosin	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
c	centi	PerR	Peroxid-Regulator
C-	Carboxy-	pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
ca.	circa	PFOR	Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase
cfu	colony forming units	red.	reduziert
CGM	,clostridial growth medium'	R	Resistenz
CoA	Coenzym A	RAM	,retrotransposition activated
CytC	Cytochrom C		
D	dimensional		
D.	<i>Desulfovibrio</i>		
Da	Dalton		
dest.	destilliert		
DIG	Digoxigenin		

DMF	Dimehtylformamid	marker'	
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Rbr	Rubrerythrin
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat	RCA	,reinforced clostridial agar'
DTE	1,4-Dithioerythritol	Rd	Rubredoxin
dUTP	Desoxyuridin-triphosphat	Rev	Revers
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>	RNA	Ribonukleinsäure
EBS	Exon Bindestelle (,exon binding site')	RNase	Ribonuklease
ed.	Herausgeber (,editor')	ROS	reaktive Sauerstoffspezies (,reactive oxygen species')
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	RT	Raumtemperatur
Em	Erythromycin	s	Sekunde
Erm	Erythromycin	s.	sieh
Ery	Erythromycin	S	Schwefel
<i>et al.</i>	und andere (,et alteri')	SAP	Alkalische Phosphatase aus Schrimps (,Shrimp Alkaline Phosphatase')
f	femto ( $10^{-15}$ )	SDS	Natrium-Dodecylsulfat
F	Farad (Maß für die elektrische Kapazität)	sec	Sekunde
Fe	Eisen	s. o.	sieh oben
FID	Flammenionisationsdetektor	SOD	Superoxid-Dismutase
FNR	Ferredoxin:NADP <sup>+</sup> Reduktase	SOR	Superoxid-Reduktase
FPLC	,fast pressure liquid chromatography'	SOE	,splicing by overlap extension'
Fw	Forward	s. u.	sieh unten
g	Gramm, Erdbeschleunigung	T	Thymin
G	Guanin	Tab.	Tabelle
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	TAE	Tris-Acetat-EDTA
GC	Gaschromatograph	TE	Tris-EDTA
Glu	Glukose	TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
Glu-Ox	Glukose Oxidase	Tm	Schmelztemperatur
h	Stunde	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
HABA	2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure	<i>T.</i>	<i>Treponema</i>
HRP	Peroxidase aus Meerrettich	t <sub>d</sub>	Verdopplungszeit
Hrsg.	Herausgeber	term.	terminal
IBS	Intron Bindestelle (,intron binding	<i>thl</i>	Thiolase
		U	Uracil, Unit (Einheit der Enzymaktivität)

	site')	UpM	Umdrehung pro Minute
i. d. R.	in der Regel	UV	ultra violett
Ind.	Induktion	ü. N.	über Nacht
Int	Integrante	V	Volt
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid	vgl.	vergleiche
k	kilo	Vol.	Volumen
KBE	Kolonie bildende Einheiten	v/v	Volumen pro Volumen
l	Liter	W	Watt
L	Länge	Wt	Wildtyp
L.	<i>Lactococcus</i>	w/v	Masse pro Volumen
LB	Luria-Bertani	X-O	Xanthin Oxidase
m	milli (10 <sup>-3</sup> ), Meter	YTG	Hefe Trypton Glukose (,yeast tryptone glucose')
M	Molar (Konzentrationsmaß; 1 Molar = 1 mol/l)	z. B.	zum Beispiel

<b>Abkürzungen für Aminosäuren:</b>					
A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

# 1 Einleitung

Die Entwicklung photosynthetisch aktiver Mikroorganismen und das damit verbundene Auftauchen von molekularem Sauerstoff in der Erdatmosphäre vor ein bis zwei Milliarden Jahren hatte weitreichende evolutionäre Veränderungen im Metabolismus der zu dieser Zeit bereits existierenden anaeroben Mikroorganismen zur Folge. Ein Beispiel dafür ist die Entwicklung Sauerstoff-abhängiger Organismen, denen es möglich war einen weitaus effizienteren Energiemetabolismus durch höhere Oxidation ihrer Substrate durchzuführen.

Eine andere Entwicklung fand bei obligaten Anaerobiern statt, welche die Grenze zur aeroben Umwelt besiedelten. Ihnen war es weiterhin nicht möglich Sauerstoff für den Energiemetabolismus zu nutzen. In Verbindung mit dem Auftreten von Sauerstoff steht immer auch die Entstehung von besonders reaktiven Sauerstoffradikalen, deren Einfluss sich auch die Anaerobier nicht vollständig entziehen konnten. Als Folge der schädigenden Einflüsse des Sauerstoffs und seiner Radikale auf verschiedene zelluläre Prozesse musste die Entwicklung von Verteidigungsmechanismen erfolgen (Storz und Imlay, 1999).

Bei Überschreitung der Kapazität dieser Schutzsysteme kommt es zur Schädigung von Zellkomponenten. Anhand dieser Kapazität und des daraus resultierenden Verhältnisses zum Sauerstoff kann eine Einteilung von Prokaryoten in verschiedene Gruppen erfolgen (Tab. E1).

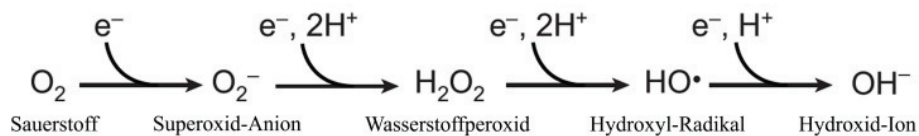
**Tab. E1: Sauerstoffbeziehungen von Mikroorganismen** (Madigan *et al.*, 1999)

Gruppe	Beziehung zu O <sub>2</sub>	Stoffwechseltyp	Beispiel
<b>Aerobier</b>			
obligat	erforderlich	aerobe Atmung	<i>Micrococcus luteus</i>
fakultativ	nicht erforderlich, besseres Wachstum mit O <sub>2</sub>	aerobe/anaerobe Atmung, Gärung	<i>Escherichia coli</i>
mikroaerophil	erforderlich in niedrigerer Konzentration als in der Atmosphäre	aerobe Atmung	<i>Spirillum volutans</i>
<b>Anaerobier</b>			
aerotolerant	nicht erforderlich, kein besseres Wachstum mit O <sub>2</sub>	Gärung	<i>Streptococcus pyogenes</i>
obligat	schädlich oder letal	Gärung oder anaerobe Atmung	<i>Clostridium acetobutylicum</i>



Da Sauerstoff nahezu ungehindert durch Zellmembranen diffundieren kann, ist der intrazelluläre Sauerstoffgehalt ähnlich dem außerhalb der Zelle.

Aufgrund ihrer sehr geringen Größe können Sauerstoffmoleküle nur sehr schwer aus Reaktionszentren vieler Proteine ausgeschlossen werden. Dies ist besonders kritisch bei Vorhandensein von Kofaktoren mit sehr niedrigem Redoxpotenzial (z. B. Flavine oder Eisen-Schwefel-Zentren) resultierend in einem Elektronentransfer von diesen Gruppen hin zum Sauerstoff. Dies führt einerseits zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS = reactive oxygen species) und andererseits zur Inaktivierung der beteiligten Enzyme (Imlay, 2008). Flavoproteine und Proteine die Eisen-Schwefel-Zentren beinhalten sind ubiquitär in allen Organismen verbreitet. Unter Einwirkung von Sauerstoff werden zwangsläufig proportional zur Sauerstoffkonzentration endogen ROS gebildet (Massey *et al.*, 1969). Die wichtigsten Sauerstoffradikale sind in Abb. E1 dargestellt.



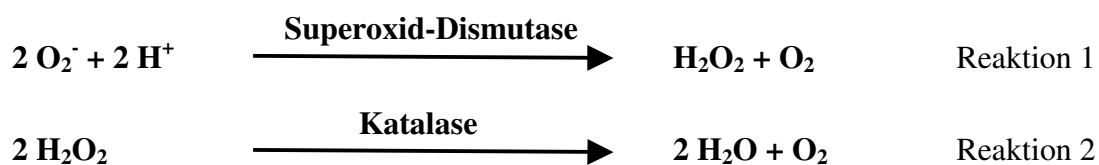
**Abb. E1: Sauerstoffradikale** (nach Imlay 2008, mod.)

ROS können zur Beschädigung von Proteinen, Lipiden, Lipoproteinen, Nukleinsäuren, Kohlenhydraten und Zellkomponenten führen (Valentine *et al.*, 1998). Zwei der wichtigsten ROS sind Superoxid ( $O_2^-$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ).  $O_2^-$  kann z. B. Thiole, Ascorbat und Catecholamine oxidieren (Farr und Kogoma, 1991). Zudem sind Proteine mit Eisen-Schwefel-Zentren sehr anfällig für eine Inaktivierung durch Superoxid (Gardner und Fridovich, 1991). Metall-Ionen können in der Zelle durch  $O_2^-$  sogar in komplexierter Form reduziert werden (als wichtigste Ionen sind hier  $Fe^{3+}$  und  $Cu^{2+}$  zu nennen). So konnte beispielsweise die Reduktion von Cytochrom C ( $Fe^{3+}$ ) zu Cytochrom C ( $Fe^{2+}$ ) beobachtet werden (McCord und Fridovich, 1988). Die Reaktionen von  $H_2O_2$  mit organischen Molekülen sind, teilweise aufgrund der Bildung von weiteren Radikalen in Anwesenheit von Metall-Ionen und eine dadurch verursachte Maskierung des eigentlichen Effekts des  $H_2O_2$ , noch nicht abschließend geklärt (Farr und Kogoma, 1991). Der wichtigste Effekt besteht anscheinend in der Bildung von Hydroxylradikalen ( $OH\cdot$ ) an reduzierten Eisen- oder Kupfer-Ionen. Diese sogenannte Fenton-Reaktion ( $Fe^{2+} + H_2O_2 + H^+ \rightarrow Fe^{3+} + HO\cdot + H_2O$ ) führt zur direkten Oxidation von Eisen-(II), welches teilweise assoziiert mit DNA vorliegt und somit Schädigungen der DNA verursacht (Imlay, 2008). Weiterhin konnten durch  $H_2O_2$  vermittelte Oxidationen von Thiolgruppen in Proteinen und reduziertem Glutathion gezeigt werden

(Welfers und Sies, 1983). Der notwendige Schutz der zellulären Systeme vor solchen unerwünschten Reaktionen führte zur Entwicklung verschiedener Entgiftungsmechanismen.

## 1.1 Entgiftungsmechanismen aerober Mikroorganismen

Aerobe Mikroorganismen verwenden einerseits molekularen Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor, andererseits wirkt Sauerstoff durch seine reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) auch auf diese Aerobier toxisch. Weit verbreitet ist in dieser Organismengruppe daher die Abwehr der ROS durch enzymatische Reaktionen. Die Entgiftung der wichtigsten Sauerstoffradikale  $O_2^-$  und  $H_2O_2$  kann in Aerobiern zu einem Detoxifikationsweg aus zwei Teilreaktionen zusammengefasst werden (Kurtz, 2003). In der ersten Reaktion wird Superoxid unter Verwendung von Superoxid-Dismutasen (SOD) zu Wasserstoffperoxid umgewandelt (Reaktion 1). Daran schließt sich die Entgiftung von Wasserstoffperoxid zu Wasser durch eine Katalase an (Reaktion 2).



Beide Teilreaktionen können durch die Enzyme unabhängig von anderen Proteinen oder Reduktionsäquivalenten durchgeführt werden. Neben der Entgiftung zu Wasser entsteht allerdings als zusätzliches Nebenprodukt molekularer Sauerstoff, der erneut Ursache ungewünschter Reaktionen sein kann. Am besten untersucht sind die oben genannten Entgiftungsmechanismen in dem fakultativen Aerobier *Escherichia coli*. Unter bestimmten Umständen kann die Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies den basalen Verteidigungslevel überschreiten (z. B. bei Begasung mit reinem Sauerstoff, bei Zugabe von  $H_2O_2$ , oder künstlicher ROS-produzierender Stoffe wie Paraquat oder Plumbagin) und so auch in aerob angezogenen *E. coli* Kulturen eine verstärkte Expression der benötigten Verteidigungsenzyme induzieren. Sie unterliegen also einer durch den Stressor induzierten Regulation. Für eine *E. coli* *sodA*- und *sodB*-Doppelmutante, welche keine SOD-Aktivität mehr aufwies (Carlioz und Touati, 1986), konnte zudem gezeigt werden, dass ohne Wirken dieses Verteidigungsmechanismus die endogene Konzentration von Superoxid ca. 2500fach über der Konzentration von aerob angezogenen *E. coli* Wildtypzellen lag (Imlay und Fridovich, 1991).

## 1.2 Entgiftungsmechanismen in Anaerobiern

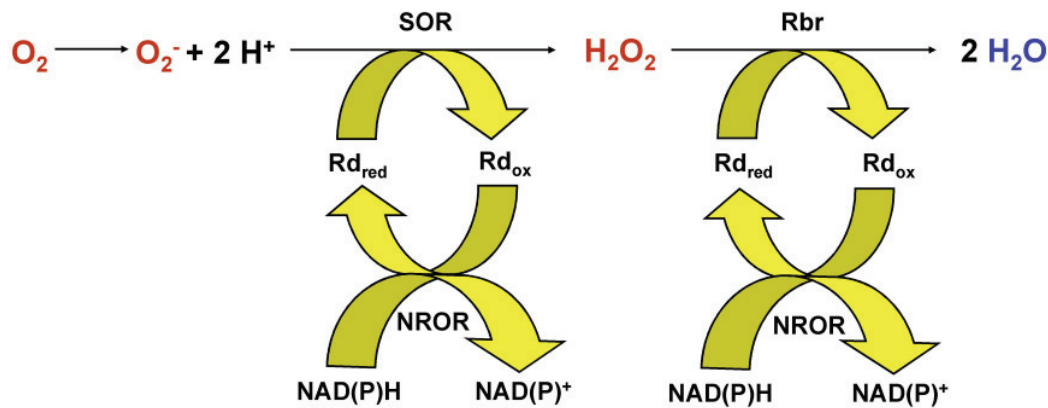
Im Allgemeinen ist in anaeroben Mikroorganismen ein Reaktionsweg zur Entgiftung von ROS über Katalase und SOD nicht vorhanden. Dies könnte darin begründet sein, dass die Entgiftung über SOD und Katalase auch zur Bildung von Sauerstoff führt und somit für Anaerobier wenig effektiv ist.

Da Anaerobier in besonders stark reduzierten Habitaten vorkommen und auch ihr Stoffwechsel sehr reduzierte Komponenten notwendig macht, ist hier die Gefahr der Bildung von ROS bei Auftreten von Sauerstoff vergleichsweise groß. Die Fähigkeit mit Sauerstoff umzugehen ist innerhalb dieser Bakteriengruppe unterschiedlich stark ausgeprägt. Obligat anaerobe Mikroorganismen können unter den Sauerstoffkonzentrationen der Atmosphäre gar nicht oder nur für sehr kurze Zeit überleben und sind nur zur Zellteilung bei Sauerstoffkonzentrationen unter 0,4 % fähig. Aerotolerante Anaerobier können sich hingegen noch bei 10 % Sauerstoff und mehr teilen (Tally *et al.*, 1975). Die meisten Anaerobier stellen bei Vorhandensein von Sauerstoff zunächst das Wachstum ein, zeigen jedoch nach Wiederherstellung des anaeroben Milieus unverändertes Wachstum (Rocha *et al.*, 1996; Karnholz *et al.*, 2002). Bisher wurde angenommen, dass die oxidative Stressantwort in Anaerobiern nicht sehr effektiv ist und dies die Unfähigkeit zum Leben unter Sauerstoffatmosphäre bedingt. Nichtsdestotrotz konnte in gewissem Umfang Sauerstoffkonsum bei Anaerobiern nachgewiesen werden. Der zugrundeliegende Mechanismus ist bisher nicht abschließend geklärt worden. So wurde z. B. für bestimmte obligat anaerobe Prokaryoten eine mögliche Respiration bei geringen Sauerstoffpartialdrücken diskutiert (Cypionka, 2000).

Die Sichtweise änderte sich mit der Entdeckung einer Superoxid-Reduktase (SOR; Jenney *et al.*, 1999). Dieses Enzym katalysiert in anaeroben Organismen die Reduktion von  $O_2^-$  ohne Bildung von  $O_2$  unter Verwendung zellulärer Reduktionsäquivalente. Zur Regeneration der SOR werden weitere Enzyme wie z. B. Rubredoxin (Rd) benötigt. Aufgrund der Beteiligung mehrerer verschiedener Proteine blieben solche Aktivitäten in anaeroben Bakterien lange Zeit unentdeckt, da häufig nur die Aktivitäten von einzelnen gereinigten Proteinen untersucht wurden. Die unmittelbare Nähe von Rubrerythrin zu den SOR- und Rubredoxingenen von *Thermotoga maritima* und *Pyrococcus furiosus* wurde als Hinweis auf eine möglicherweise ähnlich ablaufende Entgiftungsreaktion unter Beteiligung dieser Rbrs gesehen (Jenney *et al.*, 1999).

Ein System zur Entgiftung von ROS unter Einbindung dieser Proteine konnte von Weinberg *et al.* (2004) für *P. furiosus* (Abb. E2) nachgewiesen werden. Die Bekämpfung reaktiver

Sauerstoffspezies erfolgt hier im Wesentlichen durch Superoxid-Reduktase (SOR) und Rubrerythrin (Rbr) sowie den zur Regeneration reduzierter Enzyme notwendigen Proteinen Rubredoxin (Rd) und NADH:Rubredoxin Oxidoreduktase (NROR).



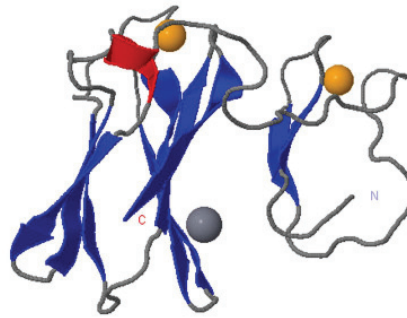
**Abb. E2: Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies in *Pyrococcus furiosus*** (nach Weinberg *et al.*, 2004; mod.)

Das Schema soll eine Übersicht über die Entgiftungsreaktionen geben, die beteiligten Komponenten sind nicht in ihren tatsächlichen Konzentrationsverhältnissen zueinander dargestellt. SOR, Superoxid-Reduktase; Rd, Rubredoxin; Rbr, Rubrerythrin; NROR, NADH:Rubredoxin Oxidoreduktase; ox, oxidiert; red, reduziert.

Das Besondere an diesem neuartigen Reaktionsweg besteht darin, dass die Entstehung von freiem Sauerstoff während der Detoxifizierung umgangen wird (vgl. Reaktionen 1 und 2) und er daher möglicherweise für Anaerobier, insbesondere diejenigen mit bedingter  $O_2$ -Toleranz, eine wichtige Rolle bei der Abwehr von oxidativem Stress zu spielen vermag.

### 1.3 Redoxenzyme zur Verteidigung gegen ROS

SORs gehören zu der Gruppe der Nicht-Häm Eisenenzyme und können in 1Fe-SORs und 2Fe-SORs unterteilt werden. Letztere besitzen zusätzlich zu dem in beiden Klassen vorkommenden mononuklearen  $[Fe(NHis)_4(SCys)]$ -Eisenzentrum ein N-terminales  $[Fe(SCys)_4]$ -Zentrum (Emerson *et al.*, 2003) (Abb. E3). Die Funktion dieser zusätzlichen Domäne konnte bisher nicht geklärt werden.

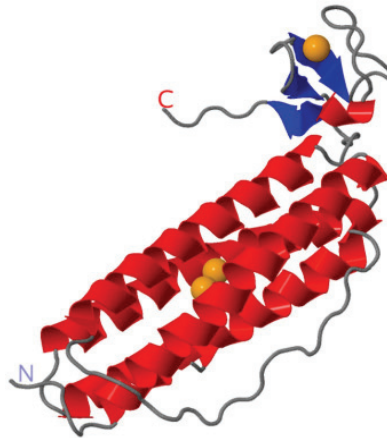


**Abb. E3:** Struktur des Desulfoferrodoxins aus *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 (Koordinaten PDB 1DFX nach Coelho *et al.*, 1996)

Dargestellt ist die 3D-Struktur von Desulfoferrodoxin mit Hilfe des Programms „Jmol Viewer“ (orange Kugel, Eisen-(III)-Ligand; dunkelgraue Kugel; Kalzium-Ligand; rot, [Fe(NHis)<sub>4</sub>(SCys)]-Domäne; hellgrau, [Fe(SCys)<sub>4</sub>]-Domäne)

Desulfoferrodoxin (Dfx), welches zuerst in sulfatreduzierenden Mikroorganismen entdeckt wurde, konnte SOD-Defektmutanten von *E. coli* komplementieren (Pianzola *et al.*, 1996; Romao *et al.*, 1999). Der vermutliche Ursprung dieses Phänomens wurde einer möglichen SOR-Aktivität des Dfx zugeschrieben. Diese Vermutung wurde dadurch bestärkt, dass eine Desulfoferrodoxin Defektmutante von *Desulfovibrio vulgaris* erhöhte Sauerstoffempfindlichkeit zeigte (Voordouw und Voordouw; 1998). Es konnte weiterhin *in vitro* für die Desulfoferrodoxine mit zwei Eisenzentren aus *D. vulgaris*, *D. desulfuricans* und *Desulfoarculus baarsii* SOR-Aktivität gezeigt werden (Romao *et al.*, 1999; Lombard *et al.*, 2000; Voordouw und Voordouw, 1998).

Rubrerythrin wurde erstmals 1972 von Bruschi und LeGall (1972) in *D. vulgaris* als Rubredoxin-ähnliches Protein mit höherem Molekulargewicht als Rubredoxin beschrieben. Die erste Charakterisierung erfolgte ebenfalls durch LeGall *et al.* (1988) als homodimeres Protein. Rubrerythrine besitzen eine charakteristische Domänenstruktur, bestehend aus einer binuklearen Nicht-Schwefel-Eisen-Domäne, vergleichbar mit der des Ferritins oder Hämyerthrins am N-Terminus und einer Rubredoxin-ähnlichen Eisen-Schwefel-Domäne des [Fe(SCys)<sub>4</sub>]-Typs am C-Terminus (Gupta *et al.*, 1995; DeMare *et al.*, 1996; Kurtz, 2006; Abb. E4). Zusammengesetzt aus diesen beiden Domänen ergab sich der Name Rubrerythrin (Rbr).



**Abb. E4: Struktur von Rubrerythrin aus *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough ATCC 29579** (Koordinaten PDB 1RYT nach DeMare *et al.*, 1996)

Dargestellt ist die 3D-Struktur von Rubrerythrin mit Hilfe des Programms „Jmol Viewer“ (orange Kugel, Eisen-(III)-Ligand; rot, N-terminale Ferritin-ähnliche Domäne; blau, C-terminale Rubredoxin-ähnliche [Fe(SCys)<sub>4</sub>]-Domäne; Amino (N)-Terminus und Carboxy (C)-Terminus sind gekennzeichnet.)

Rbrs verschiedener Organismen wurden in der Zwischenzeit relativ gut untersucht (Liu *et al.*, 1990; Van Beeumen *et al.*, 1991; Lehmann *et al.*, 1996; Coulter *et al.*, 1999 und 2000; Fournier *et al.*, 2003; Weinberg *et al.*, 2004; Kurtz, 2006). Untersuchungen an gereinigten Rubrerythrinen ergaben dabei eine Vielzahl von möglichen Reaktionen, die durch Rbrs vermittelt werden. So wurden für Rbrs z. B. SOD-Aktivität (Lehmann *et al.*, 1996; Fournier *et al.*, 2003), Ferroxidase Aktivität (Bonomi *et al.*, 1996) oder Pyrophosphatase Aktivität (Van Beeumen *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1990) unabhängig von anderen Proteinkomponenten beschrieben. Die heterologe Expression von Rbr in Katalase-negativen *E. coli* Mutanten resultierte in einer Verringerung der Empfindlichkeit gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Lumppio *et al.*, 2001). Experimente mit einer *rbr*<sup>-</sup>-Mutante von *Porphyromonas gingivalis* zeigten, dass Rbr anscheinend durch die Reduktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in den Zellen vor reaktiven Sauerstoffspezies schützt (Sztukowska *et al.*, 2002). Eine NADH-Peroxidase Aktivität wurde erstmals durch Coulter *et al.* (1999) beschrieben. Während der durch Rbr in dem oben genannten Reaktionsweg ausgeführten Peroxidase Reaktion reagiert H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vermutlich direkt mit dem binuklearen Eisenzentrum und zieht hieraus Elektronen ab. Das [Fe(SCys)<sub>4</sub>]-Zentrum überträgt anschließend Elektronen von exogenen Elektronendonoren zurück auf das 2Fe-Zentrum (Kurtz, 2006). Die Aktivitäten von Rbrs mit Sauerstoff sind typischerweise relativ niedrig im Vergleich zu den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Aktivitäten (Coulter *et al.*, 2000).

## 1.4 Sauerstoff und Clostridien

Auch für die obligat anaeroben Vertreter der Gattung *Clostridium* konnten unterschiedliche Sauerstoffempfindlichkeiten nachgewiesen werden (Azova *et al.*, 1970; Hill *et al.*, 1972), wobei hohe Sauerstoffkonzentrationen einen Wachstumsstopp bei Clostridien verursachen (Woods und Jones, 1986). Für einige *C. butyricum* Stämme wurde unter guten Wachstumsbedingungen Sauerstoffverbrauch in gewissem Umfang beschrieben. Unabhängig von der initialen O<sub>2</sub>-Konzentration im Medium sank der Sauerstoffgehalt auf einen konstanten niedrigen Wert. Andere Stämme desselben Organismus und von *C. saccharobutyricum* wiesen nur eine sehr geringe Fähigkeit zum Sauerstoffkonsum auf (Azova *et al.*, 1970). Im Anschluss an die Entfernung des gelösten Sauerstoffs aus dem Medium zeigte die Kultur von *C. butyricum* Wachstumsraten, die denen vor der Aerobisierung entsprachen. Dies wurde als Hinweis auf fehlende Schädigungen der Zellkomponenten durch Sauerstoff gewertet (Kawasaki *et al.*, 1998).

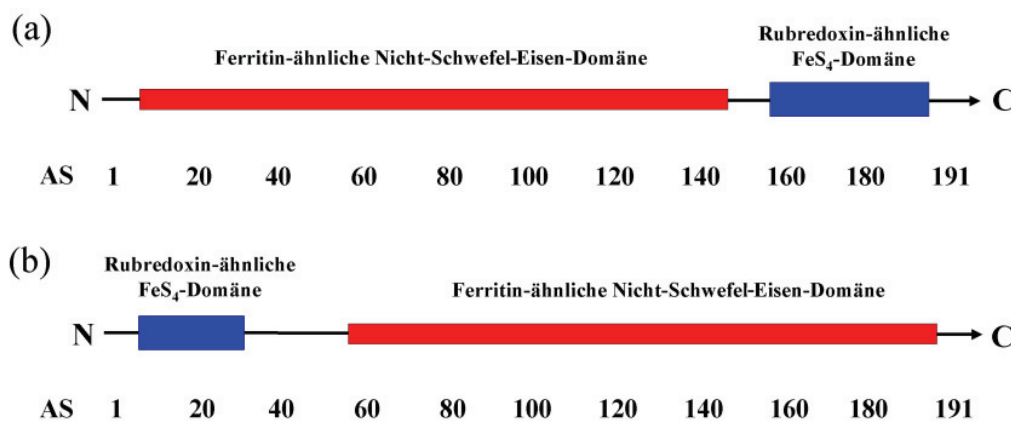
Nichtsdestotrotz ist bekannt, dass hohe Sauerstoffkonzentrationen das Wachstum von Clostridien durch Inaktivierung von Enzymen der Nukleinsäure- und Proteinbiosynthese hemmen (O'Brien und Morris, 1971).

*C. acetobutylicum* ist als obligat anaerobes Bakterium ausschließlich auf Energiegewinnung durch Gärung angewiesen. Dieses Gram-positive, stäbchenförmige, peritrich begeißelte Bakterium kommt natürlicherweise in Böden, Schlämmen oder Abwässern vor und kolonisiert somit Habitate, die zumindest zeitweilig Sauerstoffexpositionen ausgesetzt sind. Begründet durch die Fähigkeit zur Bildung von Endosporen ist dieses Bakterium ubiquitär verbreitet (Bahl und Dürre, 2001). *C. acetobutylicum* ist zur Bildung der Säuren Acetat und Butyrat sowie der Lösungsmittel Aceton, Butanol und Ethanol befähigt. Aufgrund dieser besonderen Stoffwechselendprodukte ist dieses Bakterium biotechnologisch bedeutsam und entwickelte sich zum Modellorganismus für apathogene Clostridien. Einige an Teilreaktionen zur Bildung dieser Produkte beteiligte Enzyme sind sauerstoffempfindlich. So ist z. B. die Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase (PFOR), welche an der Reaktion von Pyruvat zu Acetat beteiligt ist, sehr anfällig für eine Inaktivierung durch O<sub>2</sub> (Meinecke *et al.*, 1989).

Genau wie andere Clostridien ist *C. acetobutylicum* nicht in der Lage Häm, Cytochrome oder Katalase zu bilden (Kawasaki *et al.*, 2004). Auch im seit 2001 vollständig sequenzierten Genom von *C. acetobutylicum* ATCC 824 ist keine Katalase annotiert (Nölling *et al.*, 2001). Ein Funktionsnachweis der beiden annotierten SODs war ebenfalls bisher erfolglos (Kawasaki *et al.*, 2005). Trotzdem zeigt *C. acetobutylicum* eine gewisse Sauerstofftoleranz, die auf alternative Mechanismen zur Entgiftung von Sauerstoffradikalen hindeutet.

Die Gene für alle an dem oben genannten Reaktionsweg (s. Abb. E2) beteiligten Proteine sind auch in *C. acetobutylicum* in mindestens einer Kopie annotiert (Nölling *et al.*, 2001).

Interessanterweise sind im Genom von *C. acetobutylicum* basierend auf Ähnlichkeitsabgleichen nicht weniger als vier Rubrerythrine kodiert. Die Domänenanordnung entspricht in zwei dieser Rbrs derjenigen des Rubrerythrins von *D. vulgaris*. Die Domänen in den zwei weiteren sind jedoch vertauscht, weshalb sie als reverse Rubrerythrine (revRbr) bezeichnet wurden (May *et al.*, 2004; Abb. E5).



**Abb. E5: Domänenstruktur „normaler“ und „reverser“ Rubrerythrine** (nach May *et al.*, 2004; mod.)

(a) normales Rbr von *D. vulgaris*; (b) reverses Rbr von *C. acetobutylicum*.

Letztere werden zudem von einem gemeinsamen Operon kodiert und sind auf DNA-Ebene zu 98% identisch. Die resultierende Aminosäuresequenz unterscheidet sich nur in einer Aminosäure [Ile<sub>50</sub> → Val<sub>50</sub>]. Für dieses *revrbr*-Operon konnte das Transkriptionsmuster genereller Stressproteine nachgewiesen werden (Hillmann *et al.*, 2006). Des Weiteren konnten gesteigerte Konzentrationen reverser Rubrerythrine in 2D-Gelen nach Hitze- und Sauerstoffstress gezeigt werden (Riebe, 2005; Kawasaki *et al.*, 2005). Hingegen war für die „normalen“ Rubrerythrine kein Anstieg der Transkriptionsrate mittels Northern-Hybridisierung nach Stressapplikation nachweisbar (May *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse konnten bei den nahen Verwandten *C. perfringens* (Jean *et al.*, 2004) und *P. gingivalis* (Sztukowska *et al.*, 2002) bestätigt werden, wobei die untersuchten normalen Rubrerythrine mit C-terminaler Rubredoxin-Domäne nur eine geringe oder gar keine Induktion der Transkription infolge von oxidativem Stress zeigten. Dies deutet darauf hin, dass speziell die revRbrs generelle Stressproteine darstellen und für eine schnelle Stressabwehr eventuell auch als Teil des oben genannten Reaktionsweges in *C. acetobutylicum* eine wichtige Rolle spielen.



## 1.5 Ziele der vorliegenden Arbeit

Ein Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt auf der Klärung der Funktion von reversen Rbrs bei der oxidativen Stressabwehr von *C. acetobutylicum*. Dabei soll eine eventuelle Beteiligung an einem ROS-Entgiftungsweg, wie er für *P. furiosus* beschrieben wurde (Weinberg *et al.*, 2004), untersucht werden. Expressionsdaten nach oxidativem Stress und die Beteiligung normaler Rbrs in anderen Organismen lassen eine solche Beteiligung vermuten. Zudem konnten Kawasaki *et al.* (2007) parallel zu den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen bereits eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Reduktase Aktivität von revRbr nachweisen. Dabei blieb eine Identifizierung weiterer an dieser Reaktion beteiligter untergeordneter Proteinkomponenten jedoch aus. Bezüglich der ersten Teilreaktion (Abb. E2) ist ein Funktionsnachweis für SORs und im speziellen für Dfx bisher in Clostridien nicht erfolgt. Das Zusammenspiel verschiedener Proteinkomponenten soll in der vorliegenden Arbeit abschließend geklärt werden.

Für Experimente zur Überprüfung der Funktionalität des Reaktionsweges *in vitro* ist eine gezielte Expression der beteiligten Gene in *E. coli* und eine anschließende spezifische Aufreinigung vorgesehen. Die so erzeugten, heterolog exprimierten Proteine sollen für *in vitro* Analysen der Proteinfunktionen der an der Entgiftung von ROS in *C. acetobutylicum* beteiligten Enzyme verwendet werden. Hierbei können zum einen optisch-enzymatische Tests, zum anderen Zymogramme Anwendung finden. Ein spezielles Augenmerk besteht darin, funktionelle Unterschiede zwischen den normalen und den reversen Rbrs aufzuzeigen. Neben diesen *in vitro* Analysen zielt diese Arbeit auch auf den Nachweis der Proteinfunktionen *in vivo*. Dazu soll zum einen die Überexpression der verschiedenen Proteine in *C. acetobutylicum* und zum anderen die Herstellung von Defektmutanten erfolgen. Die morphologische und physiologische Charakterisierung solcher *C. acetobutylicum* Mutanten kann Aufschluss über die Funktion des betroffenen Proteins geben. Direkte Effekte der Überexpression der einzelnen Proteine oder des Knockouts der entsprechenden Gene sollen durch vergleichende Experimente unter Sauerstoffbegasung und unter Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gezeigt werden. Dabei sind für Überexpressionen gesteigerte, für Defektmutanten verringerte Toleranzen zu erwarten. Da eine Sauerstoffempfindlichkeit von Stoffwechselenzymen bereits beschrieben wurde (Meinecke *et al.*, 1989), sollen die erzeugten *C. acetobutylicum* Stämme auch hinsichtlich der Auswirkungen von oxidativem Stress auf das Produktspektrum untersucht werden. Die zielführenden Experimente sind auf den folgenden Seiten dargestellt und erläutert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Organismen und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismenstämme sind in Tabelle M1, mutierte *C. acetobutylicum* Stämme in Tabelle M2 aufgelistet. Vektoren sind in Tabelle M3, rekombinante Plasmide in Tabelle M4 ersichtlich. Zusätzlich befinden sich Vektorkarten im Anhang.

**Tab. M1: Mikroorganismen**

Organismus	relevanter Geno- oder Phänotyp	Herkunft/ Referenz
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Typstamm	Laborsammlung
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , $\phi$ 80 $\Delta$ lacZ M15, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , $\lambda$ , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169	Laborsammlung/ Hanahan, 1983
<i>Escherichia coli</i> ER2275	<i>trp-31</i> , <i>his-1</i> , <i>tonA2</i> , <i>rpsL104</i> , <i>supE44</i> , <i>xyl-7</i> , <i>mtl-2</i> , <i>metB1</i> , <i>el4</i> <sup>-</sup> , $\Delta$ ( <i>lac</i> )U169, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , R(zbgZ10::Tn10) Tc <sup>s</sup> , $\Delta$ ( <i>mcr-hsd-mrr</i> )114::1510, [F <sup>-</sup> , <i>proAB</i> , <i>laql</i> <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 <i>zzf</i> ::mini-Tn10 (Km <sup>r</sup> )]	Laborsammlung/ Prof. Dr. E. T. Papoutsakis, Evanston, USA/ Bermejo <i>et al.</i> , 1998

**Tab. M2: In dieser Arbeit erzeugte *C. acetobutylicum* Mutanten**

Organismus	relevanter Genotyp	Stammnummer
<i>Clostridium acetobutylicum</i> int: <i>rd</i>	<i>rd</i> ::ClosTron/ErmRAM_Int66	62
<i>Clostridium acetobutylicum</i> int: <i>dfx</i>	<i>dfx</i> ::ClosTron/ErmRAM_Int153	63
<i>Clostridium acetobutylicum</i> int: <i>rubY</i>	<i>rubY</i> ::ClosTron/ErmRAM_Int246	64
<i>Clostridium acetobutylicum</i> int: <i>rbr3A</i>	<i>rbr3A</i> ::ClosTron/ErmRAM_Int171	66
<i>Clostridium acetobutylicum</i> int: <i>rbr3B</i>	<i>rbr3B</i> ::ClosTron/ErmRAM_Int171	65

**Tab. M3: Vektoren**

Vektor	Größe (Bp)	relevantes Merkmal	Stammnr.	Herkunft/ Referenz
pASK-IBA3	3226	P <sub>tetA</sub> , ATG, C-term. <i>Strep</i> -TagII, Ap <sup>R</sup>	23	Laborsammlung/ www.IBA-GO.com
pThyda	6772	P <sub>thl</sub> , ATG, C-term. <i>Strep</i> -TagII, Ap <sup>R</sup> , Em <sup>R</sup> , oriR, <i>repL</i> , <i>hydA</i>	22	Laurence Girbal, Toulouse, France
pANI	7000	Cm <sup>R</sup> , Methyltransferase $\phi$ 3tI des Phagen $\phi$ 3tI in pACYC184; p15A, oriR	-	Mermelstein und Papoutsakis, 1993
pANII		Tet <sup>R</sup> , Methyltransferase $\phi$ 3tI des Phagen $\phi$ 3tI in pACYC184; p15A, oriR	-	Prof. Dr. Nigel Minton. University of Nottingham/

pMTL007	11845	P <sub>fac</sub> , IBS, EBS2, EBS1d, ClosTron-ErmRAM, 350-Bp-Intron, LtrA, T1/T2-Terminator, pCB102, catP, ColE1, lacI, oriT	19	Heap <i>et al.</i> , 2007 Prof. Dr. Nigel Minton. University of Nottingham/Heap <i>et al.</i> , 2007
pMTL007C-E2	8926	C. sporogenes P <sub>fdx</sub> , Ll.LtrB, HindIII, LacZα, Bsp1407I, FRT site, RAME2, LtrA, T1/T2-Terminator, repH, catP, ColE1, lacI, oriT	20	Prof. Dr. Nigel Minton. University of Nottingham/www.clostridia.net

**Tab. M4: In dieser Arbeit erzeugte rekombinante Plasmide**

Plasmid	relevante Merkmale (Vektor, endständige Schnittstellen der Insertion, Gene, Lokalisation in <i>E. coli</i> )	Insert [Bp]	Stamm- nr.
pI3rd	pASK-IBA3, BamHI, PstI, rd, cytoplasmatisch	172	1
pI3dfx	pASK-IBA3, BamHI, PstI, dfx, cytoplasmatisch	385	2
pI3rubY	pASK-IBA3, BamHI, PstI, rubY, cytoplasmatisch	595	3
pI3rbr2	pASK-IBA3, BamHI, PstI, rbr2, cytoplasmatisch	562	4
pTrd	pT, BamHI, XmaI, rd, cytoplasmatisch	172	5
pTdfx	pT, BamHI, XmaI, dfx, cytoplasmatisch	385	6
pTnror	pT, BamHI, XmaI, nrer, cytoplasmatisch	1147	7
pTrubY	pT, BamHI, XmaI, rubY, cytoplasmatisch	595	8
pTrevrbr3B	pT, BamHI, XmaI, revrbr3B, cytoplasmatisch	553	9
pMTLrd	pMTL007, HindIII, rd-Erkennungssequenz, Bsp1407I	350	12
pMTLdfx	pMTL007, HindIII, dfx-Erkennungssequenz, Bsp1407I	350	13
pMTLrbr2	pMTL007, HindIII, rbr2-Erkennungssequenz, Bsp1407I	350	14
pMTLrubY	pMTL007, HindIII, rubY-Erkennungssequenz, Bsp1407I	350	15
pMTLrevrbr	pMTL007, HindIII, revrbr-Erkennungssequenz, Bsp1407I	350	16
pMTLCnror	pMTL007C-E2, HindIII, nrer-Erkennungssequenz, Bsp1407I	350	17

## 2.2 Nährmedien

### 2.2.1 Medien für *C. acetobutylicum*

Anaerobe Nährmedien für *C. acetobutylicum* wurden nach der von Breznak und Costilow (1994) beschriebenen Methode hergestellt. Sauerstoff wurde durch Aufkochen in der Mikrowelle bis zum Farbumschlag des Redoxindikators Resazurin (Endkonzentration im Medium 0,1 % [w/v]) ausgetrieben. Die Abkühlung erfolgte unter N<sub>2</sub>-Durchgasung, ebenso das Befüllen der Kulturgefäße, welche vor dem Autoklavieren (20 min, 121 °C) luftdicht zu verschließen waren.

**2x YTG-Medium (yeast tryptone glucose medium)** (Oultram *et al.*, 1988)

Trypton	16	g
Hefeextrakt	10	g
NaCl	4	g
Glukose x H <sub>2</sub> O*	5	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ad	1000	ml

\* Glukose wurde als 50 %ige (w/v) Stammlösung anaerob angesetzt (s. o.), autoklaviert und bei RT gelagert. Die Zugabe erfolgte nach dem Autoklavieren des Mediums, direkt vor dem Beimpfen mittels steriler Spritzen und Kanülen.

**CGM-Medium (clostridial growth medium)** (Roos *et al.*, 1985; mod.)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,75	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,75	g
MgSO <sub>4</sub>	0,40	g
MnSO <sub>4</sub>	0,01	g
FeSO <sub>4</sub>	0,01	g
NaCl	1	g
Asparagin	2	g
Hefeextrakt	5	g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2	g
Glukose	5	%
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ad	1000	ml

**MS-Medium (Medium Synthétique, Sporulationsmedium)** (Monot *et al.*, 1982; mod.)

Glukose	60	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,55	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,55	g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,22	g
Essigsäure	2,3	ml
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,011	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ad	1000	ml

Der pH-Wert wurde mit NH<sub>4</sub>OH auf 6,6 eingestellt, anschließend erfolgte noch die Zugabe von 2 g/l CaCO<sub>3</sub>

**Milchmedium**

Vollmilch (3,5 % [w/v] Fett, pasteurisiert)	1000	ml
Resazurin	1	mg
Natriumthioglycolat	500	mg

**RCA-Medium (reinforced clostridial agar)**

Glukose	5	g
Hefeextrakt	3	g
Trypton	10	g
NaCl	5	g
Fleischextrakt	10	g
Na-Acetat	3	g
Cystein-HCl	0,5	g
Stärke	1	g
Agar-Agar	15	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	1000
		ml

Der pH-Wert entsprach in der Regel ohne Einstellen 6,8. Dieses Medium wurde als fertige Komponente geliefert (Oxoid).

**2.2.2 Medium für *E. coli*****LB- (Luria-Bertani-) Medium** (Sambrook *et al.*, 1989)

Trypton	10	g
Hefeextrakt	5	g
NaCl	10	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	1000
		ml

Der pH-Wert entsprach in der Regel ohne Einstellung 7 - 7,5. Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar-Agar zugesetzt.

**2.3 Medienzusätze**

Alle Medienzusätze wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm; Schleicher), aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Zur Induktion der Intronexpression vom pMTL007-Vektor in *C. acetobutylicum* erfolgte der Zusatz von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) (Heap *et al.*, 2007). Die Induktion der Proteinexpression von pASK-IBA-Derivat-tragenden Stämmen erfolgte durch Zusatz von Anhydrotetracyclin (AHT) (Schmidt *et al.*, 2007).

Die zur Selektion auf Antibiotikaresistenzen verwendeten Antibiotika sind in Tabelle M5 ersichtlich.

**Tab. M5: Verwendete Antibiotika**

Antibiotikum	Konzentration Stammlösung (mg/ml)	Arbeitskonzentration (µg/ml)	Organismus / Resistenz vermittelt durch
Ampicillin	50	100	<i>E. coli</i> / IBA-Vektoren, pT-Vektoren
Erythromycin	50	20	<i>C. acetobutylicum</i> / pT-Vektoren, integriertes Intron
Chloramphenicol	34	25	<i>E. coli</i> / pMTL007-Derivate, pMTL007C-E2, pANI-Vektor
Thiamphenicol	50	15	<i>C. acetobutylicum</i> / pMTL007-Derivate, pMTL007C-E2
Tetracyclin	10	10	<i>E. coli</i> / pANII-Vektor

## 2.4 Stammhaltung

Die Stammhaltung von *C. acetobutylicum* erfolgte als Sporensuspension im Milchmedium (Wildtyp) oder als Sporensuspension in MS-Medium mit CaCO<sub>3</sub> bei -20 °C (2.2.1). Kulturen aus Milchmedium wurden alle 6 Monate in frisches Medium überimpft und anschließend 3 Tage bei 37 °C inkubiert, bevor sie bei 4 °C eingelagert wurden.

Stammkulturen von *E. coli* wurden in LB-Medium angezogen, 1-ml-Aliquots exponentiell wachsender Zellen wurden in verschraubbaren 1,5-ml-Reaktionsgefäßen mit 0,5 ml einer LB-Glycerin-Lösung (0,4 Vol. LB-Medium, 0,6 Vol. Glycerin, Glycerin-Endkonzentration: ca. 15 – 20 % [v/v]) versetzt, gründlich durchmischt und bei -70 °C gelagert.

## 2.5 Batch-Kulturen

Batch-Kulturen von *C. acetobutylicum* wurden anaerob unter abgeschlossener N<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37 °C in Hungate-Röhrchen oder Müller-Krempel-Serumflaschen durchgeführt. Es dienten 0,02 – 0,1 Vol. Inokulum einer MS-Sporensuspension (2.4) zum Animpfen einer 10-ml-Batch-Kultur. Die Sporen wurden durch Pasteurisierung (10 min, 80 °C) reaktiviert. Nach dem Animpfen erfolgte eine Inkubation bei 37 °C. Diese Kulturen konnten zudem als Vorkultur für größere Batch-Kulturen genutzt werden.

## 2.6 Anaerobe Anzucht von *C. acetobutylicum* auf Festmedium

Die anaerobe Anzucht von *C. acetobutylicum* auf Festmedium erfolgte bei 37 °C in einer Anaeroben-Werkbank (MACS-MG-500, Meintrup DWS) unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre. Zur

Reduktion von eingetragenen Sauerstoff wurde eine maximale Konzentration von 5 % (v/v) Wasserstoff zugegeben.

## **2.7 Bestimmung der physiologischen Parameter**

### **2.7.1 Messung der optischen Dichte**

Der Wachstumsverlauf von Flüssigkulturen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen einen entsprechenden Medienleerwert in einem Spektralphotometer (Spekol 1100, Analytik Jena) verfolgt. Zur Bestimmung der optischen Dichte von in Röhrchen oder Schikanekolben wachsenden Kulturen konnte ein Röhrchenaufsatz genutzt werden.

### **2.7.2 Gaschromatographie**

Die Analyse und Quantifizierung flüssiger Gärungsendprodukte erfolgte mit einem Chrompack CP 9001 Gaschromatographen (Chrompack) unter Verwendung eines Flammenionisationsdetektors (FID). Als Trägergas diente N<sub>2</sub>, welches über einen Feuchtigkeitsfilter und anschließend über einen Sauerstofffilter nachgereinigt wurde. Neben Wasser und Sauerstoff konnten dadurch auch schweflige und chlorierte Substanzreste zurückgehalten werden. Die eingesetzten FID-Brenngase, synthetische Luft und Wasserstoff, wurden zur Entfernung organischer Substanzen über einen Aktivkohlefilter geführt. Der Einsatz einer mit Chromosorb 101 (80-100 mesh) gepackten Säule erlaubte die Analyse sowohl von Alkoholen als auch von Carbonsäuren.

#### **2.7.2.1 Probenvorbereitung**

Die zu analysierenden Zellsuspensionen wurden in 2-ml-Reaktionsgefäßen zentrifugiert (12000 x g, 10 min) und 1 ml zellfreier Überstand in ein Rollrandgefäß überführt. Als interner Standard zur Quantifizierung wurden 100 µl 55 mM Isobutanol in 2 M HCl zugesetzt. Nachdem das Gefäß mit einer Bördekkappe gasdicht verschlossen wurde, konnten 0,5 µl dieser Probe über einen automatisierten Probengeber zur Analyse in das System injiziert werden.

#### **2.7.2.2 Quantifizierung**

Mit Hilfe einer Eichlösung, die jeweils 5 mM der zu analysierenden Produkte einschließlich des internen Standards Isobutanol enthielt, wurde ein Eichchromatogramm erstellt. Die gesamte GC- und Probengebersteuerung sowie die Auswertung der Signale erfolgte mit dem Programm Maestro II (Version 2.1, Chrompack).

### 2.7.2.3 Analysebedingungen

Unter folgenden Analysebedingungen konnten die Substanzen Aceton, Butanol, Isobutanol, Butyrat, Acetat und Ethanol detektiert werden:

Chromatographiesäule	:	2 m x 2 mm Chromosorb 101 (80-100 mesh)
Säulentemperatur	:	155 - 197 °C, 9 °C/min
Trärgas	:	N <sub>2</sub> (30 ml/min)
Injektor	:	195 °C
Detektor	:	FID, 230 °C
Probenvolumen	:	0,5 µl

## 2.8 Nukleinsäure Standardtechniken

### 2.8.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen

Um Kontaminationen durch DNAsen zu verhindern, wurden alle hitzestabilen Lösungen und Geräte 20 min bei 121 °C autoklaviert. Hitzelabile Gebrauchsgegenstände wurden kurz vor Gebrauch für mindestens 20 min mit vergälltem Ethanol (70 % [v/v]) gespült und getrocknet. Hitzelabile Lösungen wurden durch einen Einwegfilter (Porengröße 0,2 µm, Schleicher) sterilfiltriert.

### 2.8.2 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen, welche im Weiteren nicht erläutert werden, sind anbei aufgeführt. Zur Einstellung geringerer Konzentrationen wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> verdünnt. Alle hier aufgelisteten Lösungen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) angefertigt.

#### 1 M Tris-HCl (pH 8)

Tris	121,14	g	1	M
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	1000	ml	

Die Einstellung auf pH 8,0 erfolgte mit konzentrierter HCl.

#### 0,5 M EDTA (pH 8,0)

Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	46,51	g	0,5	M
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	250	ml	

Die Einstellung auf pH 8,0 erfolgte mit 1 N NaOH.



**TE-Puffer**

Tris-HCl (1 M, pH 8,0)	10	ml	10	mM
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	2	ml	1	mM
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ad	1000	ml		

Das Einstellen von pH 8,0 erfolgte mit 0,1 M HCl.

**50x TAE-Puffer**

Tris	242	g	2	M
Eisessig	57	ml	1	M
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	100	ml	50	mM
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ad	1000	ml		

Das Einstellen von pH 7,5 erfolgte mit 0,1 M HCl.

**2.8.3 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren****2.8.3.1 Phenol-Chloroform-Extraktion** (Sambrook *et al.*, 1989)

Zur Reinigung und Deproteinierung von DNA-Lösungen diente die Phenol-Chlorform-Extraktion. Sie wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Zugabe von 1 Vol. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, [v/v], gesättigt mit TE-Puffer, pH 7,8 - 8; Roth)
2. Durchmischen der Lösung bis eine Emulsion entsteht (Plasmide/ PCR-Produkte können „gevortext“ werden)
2. Phasentrennung durch Zentrifugation (Biofuge Fresco, Heraeus) für 3 min bei 6000 UpM und RT
3. Überführung der oberen, wässrigen Phase in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß und Wiederholung der Schritte 1. - 4. (bis die Interphase proteinfrei ist)
4. Entfernung von Phenolresten durch Zugabe von 1 Vol. Chloroform-Isoamylalkohol (24:1, [v/v]) zur wässrigen Phase und Wiederholung der Schritte 2. - 4.
6. Fällung der DNA (2.8.3.3; Fällung der PCR-Ansätze mit Ammoniumacetat, 2.8.3.4)

**2.8.3.2 Isopropanolfällung** (Sambrook *et al.*, 1989)

Diese Methode wurde nur zur Fällung von Plasmid-DNA während der Plasmidisolierung aus *E. coli* eingesetzt. Sie ist näher unter 2.8.6.2 beschrieben.

### **2.8.3.3 Natriumacetat-Ethanol-fällung** (Sambrook *et al.*, 1989)

Nukleinsäurelösungen wurden mit 0,1 Vol. Natriumacetat (3 M, Roth; die Einstellung von pH 5,2 erfolgte mit konz. HCl) und 2,5 Vol. Ethanol (96 % [v/v], reinst) versetzt, gründlich gemischt und bei -20 °C für 1 h (alternativ 4 °C ü. N. bzw. -70 °C für 30 min) inkubiert. Das weitere Vorgehen entsprach der nach einer Isopropanolfällung (2.8.3.2). Verwendung fand diese Methode vorrangig bei der Fällung von Plasmid-DNA, Restriktionsansätzen und chromosomaler DNA.

### **2.8.3.4 Ammoniumacetat- Ethanol-fällung** (Crouse und Amrose, 1987)

Die wässrige DNA-Lösung wurde mit 1 Vol. Ammoniumacetat (7,5 M, Roth; die Einstellung von pH 7,5 erfolgte mit 1 N NaOH) und 3 Vol. Ethanol (96 % [v/v], reinst) versetzt, gründlich gemischt und für 30 min bei -70 °C inkubiert. Die weitere Behandlung erfolgte wie unter 2.8.3.2. beschrieben. Anwendung fand diese Methode bei der Fällung von PCR-Fragmenten. Ihr Vorteil besteht in der geringen Kopräzipitation von Salzen und Oligonukleotiden.

## **2.8.4 Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle**

### **2.8.4.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle**

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentrationen in wässrigen Lösungen erfolgte photometrisch (Ultrospec 3000, Amersham) durch Messung der Absorption bei 260 nm in Quarzküvetten oder für diesen Wellenlängenbereich geeigneten Plastikkuvetten. Die Proben wurden in der Regel mit destilliertem Wasser oder TE-Puffer 1:10 und 1:50 verdünnt und beide Verdünnungen für die Konzentrationsbestimmung eingesetzt. Für eine OD<sub>260</sub> von 1 wurde für doppelsträngige DNA eine Konzentration von 50 µg/ml zugrundegelegt (Sambrook *et al.*, 1989). Die Reinheit der DNA-Lösung ließ sich aus dem Verhältnis der OD<sub>260</sub> zur OD<sub>280</sub> abschätzen. Für reine DNA-Lösungen liegt dieser Wert bei 1,8 (Sambrook *et al.*, 1989). Diese Methode wurde zur Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle der aus der Mini-Plasmidpräparation (2.8.6.2) erhaltenen Plasmid-DNA verwandt. Die Bestimmungen wurden anschließend zusätzlich in Agarosegelelektrophoresen überprüft (2.8.5).

### **2.8.4.2 Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle im Agarosegel**

Zur Kontrolle der unter 2.8.4.1 photometrisch gewonnenen Daten, der Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle der aus der Mini-Plasmidpräparation erhaltenen Plasmid-DNA (2.8.6.2) sowie der PCR-Fragmente wurden die entsprechenden Nukleinsäure-Lösungen mit sterilem Wasser auf verschiedene Verdünnungen eingestellt. Zur Reinheitskontrolle und visuellen Mengenabschätzung erfolgte die Auftrennung der einzelnen

Verdünnungen in einem Agarosegel parallel zu Plasmidstandards bekannter Konzentrationen (10 ng, 50 ng, 100 ng). Zum Zwecke der erhöhten Genauigkeit sollte das als Standard eingesetzte Plasmid in der Größe dem „Zielploid“ entsprechen und ggf. vor Gebrauch linearisiert werden.

## 2.8.5 Agarosegelelektrophorese

### 2.8.5.1 Standard-Agarosegelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989 mod.)

Die horizontale Agarosegelelektrophorese diente der analytischen sowie präparativen Auftrennung von DNA-Molekülen und ihrer Qualitäts- und Quantitätsbeurteilung (2.8.4.2). Hierzu wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,8 % bis 1,5 % ([w/v] in 1x TAE-Puffer, 2.8.2) verwendet. Zur Markierung der Lauffront und um ein möglichst vollständiges Einsinken der Proben in die Geltaschen zu gewährleisten, wurden die Proben vor dem Auftragen mit 0,2 Vol. 6x Loading Dye versetzt. Als Längenstandard wurde ein 1-kBp-Marker mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 70 V bis 90 V (Power Pack P25, Biometra) unter Verwendung von 1x TAE-Puffer als Laufpuffer bis die Bromphenolblaubande  $\frac{3}{4}$  des Gels durchlaufen hatte. Anschließend erfolgte die Markierung der Nukleinsäuren im Gel durch eine 30minütige Inkubation in einem Ethidiumbromid-Bad (1 µg/ml). Die Entfärbung der Gelmatrix wurde durch Wässerung für ca. 10 min erreicht. Die Visualisierung der Nukleinsäuren erfolgte bei 254 nm mit Hilfe eines Transilluminators in einer Photodokumentationsanlage (Gelprint 2000, MWG).

#### 6x Loading Dye

Bromphenolblau	125	mg	0,25	% (w/v)
Xylencyanol	125	mg	0,25	% (w/v)
Glycerin (86 % [v/v])	17,44	ml	30	% (v/v)
Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O (0,5 M, pH 8,0)	5	ml	50	mM
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	250	ml	

Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

### 2.8.5.2 Nukleinsäure-Längenstandards

Als Größenmarker bei Agarosegelelektrophoresen dienten unterschiedliche kommerzielle Fragmentgemische wie „Gene-Ruler™ 1 kBp DNA Ladder“ (Fragmentgrößen in Bp: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250; Fermentas) oder „GeneRuler™ 100 Bp Plus DNA Ladder“ (Fragmentgrößen in Bp: 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100; Fermentas).

## 2.8.6 Isolierung von Nukleinsäuren

### 2.8.6.1 Isolierung chromosomaler DNA aus *C. acetobutylicum*

Zum Zwecke der Isolierung chromosomaler DNA aus *C. acetobutylicum* nach Bertram (1989, mod.), wurden die Zellen in 100 ml 2x YTG-Medium oder CGM angezogen (Inokulation mit einer 10-ml-Vorkultur). Die Ernte erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von 1,0 bis 1,2 durch Zentrifugation in SS34 Röhrchen bei 5000 UpM für 5 min und 4 °C. Das erhaltene Zellsediment wurde dreimal mit 10 ml 1x TAE-Puffer (supplementiert mit 10 % [w/v] Saccharose) gewaschen und anschließend bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert. Die Isolierung der DNA erfolgte nach folgendem Protokoll:

1. Suspendieren der gefrorenen Zellpellets in 3 ml 1x TAE (mit 10 % [w/v] Saccharose), Erwärmung auf 37 °C
2. Zugabe von 1 ml Lysozym-RNaseA-Lösung, vorsichtiges Schwenken, Inkubation für 30 min bei 37 °C
3. Zugabe von 500 µl 0,5 M EDTA (pH 8), 40 µl 1 M Tris-HCl (pH 8) und 300 µl SDS-Lösung (20 % [w/v]), vorsichtiges Schwenken; Inkubation für bis zu 10 min bei 37 °C
4. Zugabe von 200 µl ProteinaseK-Lösung, vorsichtiges Schwenken Inkubation für 60 min bei 37 °C
5. Erhöhung der Ionenstärke durch Zugabe von 1,4 ml 5 M Natriumperchlorat
6. Extraktion mit 1 Vol. Chloroform-Isoamylalkohol (24:1 [v/v])
7. Zentrifugation für 10 min bei 7500 UpM und 4 °C;
8. Abnehmen der oberen, wässrigen Phase
9. Zweimalige Wiederholung der Schritte 6. – 9.
10. Fällung der DNA aus der wässrigen Phase durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol, fünfminütige Inkubation bei RT
11. Zentrifugation für 20 min bei 13000 UpM und 4 °C
12. Trocknen des DNA-Pellets für ca. 60 min
13. Lösen des DNA-Pellets in 2 ml TE-Puffer
14. Zugabe von 100 µl RNaseA-Lösung, Inkubation für 15 min bei 37 °C
15. Zugabe von 200 µl ProteinaseK-Lösung, Inkubation ü. N. bei 37 °C
16. Erhöhung des Gesamtvolumens mit sterilem Wasser auf 4 ml
17. Zugabe von 600 µl 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 5,2)
18. Dreimalige Extraktion mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1 [v/v]), s. 6. – 9)

19. Fällung der DNA durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol, fünfminütige Inkubation bei RT
20. Zentrifugation für 20 min bei 13000 UpM und 4 °C
21. Zweimaliges Waschen des DNA-Pellets mit Ethanol (70 % [v/v], reinst)
22. Trocknen des DNA-Pellets
23. Aufnahme DNA-Pellets in 200 µl sterilen TE-Puffer

Zentrifugationen erfolgten in einer RC 5C Plus-Zentrifuge (Kendro), Qualitätsüberprüfungen der DNA photometrisch (2.8.4.1) und mittels Agarosegelelektrophorese (2.8.4.2).

#### **Lysozym-RNaseA-Lösung**

Lysozym (Roth)	200	mg
RNaseA (Roth)	20	mg
Tris-HCl (1 M, pH 8,0)	0,25	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ad	10	ml

Die Lösung wurde sterilfiltriert und in 1-ml-Aliquots bei -20 °C gelagert.

#### **ProteinaseK-Lösung**

ProteinaseK (Amresco)	20	mg
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ad	1	ml

Die Lösung wurde in 20-µl-Aliquots bei -20 °C gelagert. Nach einmaligem Auftauen wurde der Rest der Lösung verworfen.

#### **RNaseA-Lösung**

RnaseA (Roth)	2	mg
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ad	1	ml

Zur Inaktivierung von DNasen wurde die Lösung für 15 min auf 100 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 10-µl-Aliquots bei -20 °C gelagert.

#### **1x TAE-Puffer** (supplementiert mit 10 % [w/v] Saccharose)

Die Stammlösung (2.8.2) wurde entsprechend verdünnt und mit 10 % (w/v) Saccharose versetzt.

### **2.8.6.2 Plasmid-Mini-Präparation aus *E. coli***

Zum „Screening“ vieler potentieller Klone auf das Vorhandensein von rekombinanten Plasmiden und deren schneller Isolierung diente eine Modifikation der Schritte des Qiagen-

Mini-Kits (Qiagen) ohne Säulenaufreinigung, die prinzipiell auf dem Protokoll der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979) beruht.

Von einer ü. N. in LB-Medium (versetzt mit Ap, 2.3) gewachsenen Kultur, wurden zweimal 2 ml durch Zentrifugation (6000 UpM, 5 min und 4 °C; Biofuge Fresco, Heraeus) geerntet. Das Pellet wurde in 300 µl Puffer P1 suspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Es folgten die Zugabe von 300 µl Puffer P2, das vorsichtige Durchmischen der Suspension und eine Inkubation von maximal 4 min bei RT. Durch Zugabe von 300 µl Puffer P3 wurde der Ansatz neutralisiert. Hierbei kam es zur Ausflockung eines weißen Präzipitats, bestehend aus SDS, Zelltrümmern, chromosomaler DNA und denaturierten Proteinen. Dies konnte durch zweimalige 20minütige Zentrifugation bei 13000 UpM und 4 °C (Biofuge Fresco, Heraeus) aus dem Ansatz entfernt werden. Der Überstand wurde nach jedem Zentrifugationsschritt mit einer Pipette in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt. Die DNA im Überstand konnte im Anschluss an den zweiten Zentrifugationsschritt durch eine Isopropanolfällung gewonnen werden. Die wässrige DNA-Lösung wurde dazu mit 0,7 Vol. Isopropanol versetzt, gründlich gemischt und anschließend durch Zentrifugation für 20 min bei 13000 UpM (Zentrifuge s. o.) und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert und Salze aus dem DNA-Pellet durch Spülen mit eiskaltem Ethanol (80 % [v/v], reinst) ausgewaschen. Anschließend wurde das DNA-Pellet bei RT getrocknet und in einem geeigneten Volumen H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> oder TE-Puffer (TE nur bei längerer Lagerung) aufgenommen. Die auf diese Weise gewonnene Plasmid-DNA konnte sowohl als PCR-Matrize als auch für Restriktionsanalysen und Sequenzierreaktionen eingesetzt werden.

### **Puffer P1**

Tris	0,606	g	50	mM
Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	0,37	g	10	mM
RNaseA (10 mg/ml, s. u.)	1	ml	100	µg/ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ad	100	ml		

Der pH-Wert wurde mit 0,1 M HCl auf 8,0 eingestellt. Die Zugabe der RNaseA-Lösung erfolgte nach dem Autoklavieren der Lösung. Eine Lagerung konnte bei 4 °C für maximal 4 Wochen vorgenommen werden.

### **Puffer P2**

SDS (10 % [w/v], in sterilem H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> )	10	ml	1	% (w/v)
NaOH	1,17	g	200	mM
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ad	100	ml		

**Puffer P3**

Kaliumacetat		58,88	g	3	M
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	100	ml		

Das Einstellen von pH 5,5 erfolgte mit Eisessig.

**RNaseA-Lösung**

RNaseA (Roth): 10 mg/ml in Tris-NaCl-Puffer (pH 8,0)

Nach dem Ansetzen wurde die Lösung zur Inaktivierung von DNasen für 15 min auf 100 °C erhitzt und nach dem Abkühlen aliquotiert. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -20 °C.

**Tris-NaCl-Puffer**

Tris-HCl (1 M, pH 8,0)		1	ml	10	mM
NaCl		0,087	g	15	mM
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	100	ml		

**2.8.7 Enzymatische Modifikationen von DNA****2.8.7.1 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen**

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen liefert lineare DNA-Fragmente mit definierten Enden. In analytischen Ansätzen mit einem Gesamtvolumen von 10 µl wurden bis zu 1 µg Plasmid-DNA mit 1 – 10 U Enzym gespalten. Gemäß den Herstellerangaben ([www.Fermentas.com](http://www.Fermentas.com)) erfolgte die Inkubation des Ansatzes in entsprechenden Puffersystemen des Herstellers bei den notwendigen Temperaturen ü. N. oder für mindestens 3 h. Lagen die Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen nur in geringer Entfernung von einem freien Ende der DNA (z. B. bei PCR-Produkten), so wurde die Inkubation ü. N. durchgeführt. Wenn Mehrfachrestriktionen unter Verwendung unterschiedlicher Pufferbedingungen notwendig waren, wurde nach der ersten Restriktion eine Natriumacetat-Ethanol-fällung (2.8.3.3) notwendig. Eine Hitzeinaktivierung der Restriktionsendonukleasen erfolgte im Anschluss an den letzten Restriktionsschritt.

**2.8.7.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten** (Sambrook *et al.*, 1989)

Um eine Selbstligation linearisierter Vektor-DNA zu vermeiden, wurde diese am 5'-Ende durch Zugabe der alkalischen Phosphatase aus Shrimps (SAP, Roche) direkt in den Restriktionsansatz im Anschluss an die Spaltung des Vektors dephosphoryliert. Die Shrimps-Phosphatase hat gegenüber anderen Phosphatasen den Vorteil, dass sie durch Hitze vollständig inaktivierbar ist. Bis zu 10 µg linearisierte Vektor-DNA wurden mit 1 U SAP

(1 U/ $\mu$ l) und 1x SAP Puffer (10x konzentriert, Roche) versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Hitzeinaktivierung der SAP durch 20minütiges Erhitzen auf 65 °C und eine Weiterbehandlung der Vektor-DNA entsprechend 2.8.7.3.

### **2.8.7.3 Ligation von DNA-Fragmenten**

Der Erfolg einer Ligation ist unter anderem abhängig von der Länge und der Konzentration der Vektor- und der zu integrierenden DNA (Dugaiczky *et al.*, 1975). Zunächst wurde als Voraussetzung für eine erfolgreiche Ligation die Konzentration der zu ligierenden Fragmente bestimmt. Es wurde dann im Ligationsansatz i. d. R. ein molares Verhältnis von 1:3 bis 1:1 (Vektor:Insert) gewählt. Pro Ansatz wurden 100 ng Vektor und die adäquate Menge Insert-DNA eingesetzt (NEB Katalog 2002/2003, Reference Appendix). Das Standardvolumen der Ligationsansätze betrug 20  $\mu$ l. Die T4-DNA-Ligase wurde mit einer Konzentration von 0,1 U/ $\mu$ l im entsprechenden Ligationspuffer (beide Fermentas) eingesetzt. Die Reaktion erfolgte bei 22 °C für 6 h oder über Nacht. Bei einigen Ligationen wurde auch eine Inkubation ü. N. bei 4 °C vorgenommen, um die Eigenbewegung der DNA-Enden zu minimieren. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung der T4-DNA-Ligase zur Erhöhung der Transformationseffizienz bei 65 °C für 20 min (Arbeitsanleitung T4-DNA-Ligase, Fermentas). Die Ligationsansätze konnten direkt für die Hitzeschock-Transformation von CaCl<sub>2</sub>-kompetenten *E. coli* Zellen eingesetzt (2.9.2) bzw. bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert werden.

## **2.8.8 In vitro-Amplifikation von DNA mittels PCR**

### **2.8.8.1 Standard-Reaktionsbedingungen**

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) konnten gezielt DNA-Fragmente amplifiziert werden. Die dafür eingesetzte *Pwo*-Polymerase (peqLab) gewährleistete aufgrund ihrer 3'-5'-Proofreading-Exonuklease Aktivität eine Amplifikation mit einer 10 mal geringeren Fehlerrate (ca. 10<sup>-6</sup>/Base) als die *Taq*-Polymerase (Herstellerangaben). Der Reaktionsansatz war folgendermaßen zusammengesetzt:



DNA-Matritze		200	ng
Primer	je	1	μM
dNTP-Gemisch (10 mM, Biomers)		200	μM
<i>Pwo</i> -Polymerase (1 U/μl, peqLab)		1	U
10x <i>Pwo</i> -Reaktionspuffer komplett		10	μl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	100	μl

Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler (Progene, thermo-Dux) nach folgendem PCR-Programm:

Denaturierung	94 °C	2 min	1 x
Denaturierung	94 °C	30 s	}
Annealing	45 °C	30 s	
Amplifikation	72 °C	1 min/kBp Fragment	}
Abschlussynthese	72 °C	5 min	
Lagerung	4 °C	∞ unendlich	1 x

Als Matritze für die PCR diene chromosomale DNA von *C. acetobutylicum* ATCC 824 (2.8.6.1). Für PCR-screenings wurde zur Gewinnung der chromosomalen DNA eine *C. acetobutylicum* Kolonie in 30 μl H<sub>2</sub>O suspendiert und für 10 min bei 99 °C erhitzt. Von dieser Suspension konnten sofort (ohne Abzentrifugieren des Zellmaterials) 5 μl in einem Standard PCR-Ansatz von 50 μl als Template eingesetzt werden. Die Primer für die PCR wurden so konstruiert, dass am 5'- und am 3'-Ende des Amplifikates unter Billigung von Fehlpaarungen Restriktionsschnittstellen eingefügt wurden. Hierbei wurden gleichzeitig das geneigene Stoppkodon mutiert. Die Schmelztemperaturen der Primer konnten nach der von Chester und Marshak (1993) beschriebenen Formel  $T_m = 69,3\text{ °C} + 0,41 * GC\ \% - 650/L$  (GC %, prozentualer Anteil der Basen Guanin und Cytosin in der Oligonukleotidsequenz; L, Länge des Oligonukleotids) berechnet werden. Primer und Gegenprimer sollten dabei annähernd gleiche Schmelztemperaturen haben. Die Kontrolle der erfolgreichen Amplifikation erfolgte im Agarosegel (2.8.5). Vor der weiteren Verwendung der PCR-Amplifikate erfolgte eine Aufkonzentrierung (2.8.3.4) und eine Konzentrationsbestimmung (2.8.4).

### 2.8.8.2 Aufreinigung der PCR-Amplifikate

Um eine möglichst gute Qualität der PCR-Amplifikate für weitere Bearbeitungsschritte zu gewährleisten, erfolgte eine Aufreinigung der PCR-Produkte mittels des „QIAquick PCR

Purification Kit“ Protokolls (Qiagen) entsprechend der Angaben des Herstellers. Die Aufreinigung diente der Abtrennung der PCR-Amplifikate (100 Bp bis 10 kBp) von Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen. Alle Puffer wurden dem Kit entnommen. Alternativ konnte auch eine Ammoniumacetat-Ethanol-fällung (2.8.3.4) erfolgen.

Um eine Abtrennung eventueller unspezifischer PCR-Fragmente aus dem PCR-Ansatz zu realisieren, konnte das gewünschte spezifische PCR-Fragment nach Auftrennung des PCR-Gemisches in einem Agarosegel (2.8.5) daraus extrahiert werden. Dies war besonders wichtig bei anschließender Verwendung dieses PCR-Fragmentes als Sonde für Southern-Blots (2.8.10). Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das „peqGOLD Gel Extraction Kit“ (peqLab) genutzt. Die zu extrahierende DNA-Bande wurde nach Färbung im Ethidiumbromidbad aus einem 0,8 – 2 %igen Agarosegel unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend gemäß den Herstellerangaben unter Verwendung der entsprechenden Puffer behandelt.

## **2.8.9 DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierung von Plasmiden wurde bei der Firma AGOWA durchgeführt. Dafür wurden in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß 7 µl aufgereinigte Plasmid-DNA (Mini-Präparation, 2.8.6.2) mit 1,5 µl eines für das Plasmid spezifischen Primers (100 µM, Endkonz. 1 µM) versetzt und mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auf 15 µl Endvolumen aufgefüllt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß mit Parafilm versiegelt und konnte nun versendet werden.

## **2.8.10 Southern-Blot (Southern, 1975)**

Diese Methode diente dem spezifischen Nachweis und der Größenbestimmung chromosomaler DNA-Fragmente. Sie fand Anwendung beim Nachweis von Mutationen in *C. acetobutylicum* Stämmen.

### **2.8.10.1 DNA-Markierung**

Die DNA-Sonden ermöglichen die Untersuchung einer Gensequenz in einem komplexen DNA-Gemisch. Sie können durch den Einbau von Desoxyuridin-Nukleotiden (dUTPs) mit kovalent gebundenem Digoxigenin markiert und für Southern-Hybridisierungen verwendet werden. Dabei kann sich der „random primed“-Prozess zunutze gemacht werden. Der Einbau von Digoxigenin-markiertem Desoxyuridin-triphosphat geschieht während der matrizenabhängigen Synthese von komplementären DNA-Strängen durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I. Für Markierungsansätze wurde ein „DIG DNA Labeling Kit“ (Roche) nach den Angaben des Herstellers genutzt. Als Matrize für die

Markierungsreaktion wurden eigens dafür hergestellte PCR-Produkte mit einer Länge zwischen 200 und 1000 Bp verwendet. Zur Vorbehandlung und Sicherstellung der Spezifität wurde das Zielfragment durch eine Gelelution (2.8.8.2) aufgereinigt und anschließend seine Konzentration (2.8.4) bestimmt. Die Menge an DNA im Markierungsansatz sollte ca. 1 µg betragen. Die Matrizen-DNA wurde für 10 min bei 100 °C im Heizblock denaturiert und sofort auf Eis überführt. Folgende Komponenten des DIG-DNA-Labeling-Kits wurden auf Eis hinzugefügt:

Hexanukleotid-Mix (10x)	2	µl
dNTP-Markierungs-Mix (10x) *	2	µl
Klenow-Enzym (2 U/µl)	1	µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ad	20	µl

\* (1 mM dATP, 1mM dGTP, 1 mM dCTP, 0,65 mM dTTP, 0,35 mM DIG-11-dUTP, pH 7,5 [20 °C])

Der vollständige Reaktionsansatz wurde gemischt und für 1 - 20 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde bei 65 °C für 10 min abgestoppt.

### 2.8.10.2 Übertragung von Nukleinsäuren auf Membranen

Um DNA auf Nylonmembranen zu übertragen, fand das Prinzip des „Kapillarblotting“ Anwendung (Southern, 1975). Zunächst wurde DNA isoliert (2.8.6.1), mit spezifischen Restriktionsendonukleasen restriktiert (2.8.7.1) und im Agarosegel aufgetrennt (2.8.5). Diejenige Spur, welche den Marker (2.8.5.2) enthielt, wurde zur späteren Größenbestimmung abgetrennt und im Ethidiumbromid-Bad gefärbt. Das restliche Gel wurde 10 min bei RT in 0,25 M HCl geschwenkt. Es schloss sich eine Denaturierung und eine Neutralisierung für je 30 min bei RT in den unten aufgeführten Puffern an. Während dieser Zeit wurde eine Nylonmembran exakt auf Gelgröße zugeschnitten. Nach einer 10minütigen Äquilibrierung des Gels sowie der Nylonmembran in 2x SSC-Puffer erfolgte der Aufbau der Blotapparatur (eigener Bauart). Dazu wurden zunächst 5 Lagen Whatman-Papier mit 2x SSC-Puffer getränkt und auf 5 - 10 cm Filterpapier geschichtet. Darauf wurde die ebenfalls mit 2x SSC-Puffer befeuchtete Nylonmembran blasenfrei aufgelegt. Direkt auf diese Membran wurde das Agarosegel luftblasenfrei platziert. Um den blasenfreien Kontakt der Komponenten zu gewährleisten, wurde zuoberst eine Glasscheibe und ein Gewicht von 200 g aufgelegt. Der Transfer der DNA aus dem Gel auf die Membran erfolgte nun über Nacht. Nach der Hybridisierung wurde die Membran von jeder Seite für 3 min in der Fotodokumentationsanlage (Gelprint 2000, MWG) mit UV-Licht fixiert und danach getrocknet.

**10x SSC-Puffer**

NaCl	87,7	g	1,5	M
Na <sub>3</sub> -Citrat x H <sub>2</sub> O	44,1	g	0,15	M
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	100	ml	

Der pH-Wert von 7,0 wurde mit konzentrierter HCl eingestellt.

**Denaturierungspuffer**

NaCl	35,06	g	0,6	M
NaOH	16	g	0,4	M
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	1000	ml	

**Neutralisierungspuffer**

NaCl	87,66	g	1,5	M
Tris	60,55	g	0,5	M
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	1000	ml	

Der pH-Wert von 7,5 wurde mit konzentrierter HCl (ca. 30 ml) titriert.

**2.8.10.3 Hybridisierung**

Die kovalent auf der Nylonmembran fixierte DNA (2.8.10.2) wurde in gut verschließbaren Behältern zunächst eine Stunde mit 15 ml Hybridisierungslösung zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen vorhybridisiert. Die getrocknete Membran wurde in ein Hybridisierungsröhrchen (Ochs) überführt, wobei die DNA der Innenseite des Röhrchens zugewandt war. Ca. 0,25 ng/ml der markierten DNA-Sonde (2.9.10.1) wurden in 5 ml Hybridisierungslösung suspendiert. Nach dem Denaturieren dieser Lösung (10 min bei 100 °C) wurde die Vorhybridisierungslösung verworfen und die kompletten 5 ml in das Hybridisierungsröhrchen mit der Membran gegeben. Die Hybridisierung der Membran mit der DNA-Sonde wurde ü. N. bei 42 °C unter gleichmäßiger Rotation in einem Hybridisierungsofen (Biometra) durchgeführt. Danach wurde die Membran 2 x für 5 min bei RT in 2x SSC, 0,1 % SDS (w/v) gewaschen, um die Hybridisierung zu stoppen und ungebundene Reste der Sonde zu entfernen. Anschließend wurde die Membran 2 x 15 min in 0,1x SSC, 0,1 % SDS (w/v) bei 42 °C inkubiert. Die so behandelte Nylonmembran wurde direkt zur Detektion verwendet oder trocken gelagert.

**Hybridisierungslösung**

20x SSC-Puffer (s. o.)	25	ml
Formamid (deionisiert)	50	ml
SDS (10 % [w/v])	200	µl
N-Laurylsarkosin (20 % [w/v])	200	µl
Blocking-Reagenz o. Casein	2	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ad	100	ml

**2.8.10.4 Detektion Digoxigenin-markierter DNA**

Der Nachweis spezifischer DNA-Fragmente nach Markierung mit dem Hapten Digoxigenin (DIG) beruht auf der Interaktion von DIG und DIG-spezifischen Antikörpern. Dabei wird eine alkalische Phosphatase als Reportergruppe an den Antikörper angeheftet. Diese setzt die Substrate NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid) und BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat) zu blauem Indigo um. Um einen Nachweis der Digoxigenin-markierten DNA (2.9.10.1) zu führen, wurde die Membran (2.8.10.3) 1 min mit Puffer 1 gewaschen und anschließend 1 - 2 h mit Puffer 2 inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit Puffer 1 für 5 min folgte eine Inkubation der Membran mit 20 ml der Antikörper-Konjugat-Lösung für 30 min. Danach wurde die Nylonmembran erneut 2 x für 15 min mit Puffer 1 gewaschen und für 2 min mit Puffer 3 äquilibriert. Die oben genannte Farbreaktion erfolgte nach Zugabe von 10 ml Färbelösung zu der Membran und resultierte in der Visualisierung von DNA-Banden. Diese Reaktion konnte nach ausreichender Färbung durch intensives Waschen mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gestoppt werden.

**Puffer 1**

Tris-HCl (1 M, pH 8,0)	100	ml	0,1	M
NaCl	8,76	g	0,15	M
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ad	1000	ml		

Der pH-Wert wurde mit konzentrierter HCl auf 7,5 eingestellt.

**Puffer 2**

Blocking- Reagenz o. Casein	2,5	ml	0,5	% (w/v)
Puffer 1 ad	50	ml		

**Puffer 3**

Tris-HCl (1 M, pH 8,0)	100	ml	0,1	M
NaCl	5,84	g	0,1	M
MgCl <sub>2</sub>	4,76	g	0,05	M
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ad	1000	ml		

Der pH-Wert wurde mit konzentrierter HCl auf 9,5 eingestellt.

**Antikörper-Konjugat-Lösung (1:5000)**

Anti-Digoxigenin-AP (Roche)	4	µl
Puffer 1 ad	20	ml

**Färbelösung**

Puffer 3	10	ml
NBT	45	µl
BCIP	35	µl

**2.9 Transformation von *E. coli*****2.9.1 Herstellung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli* Zellen** (Hanahan, 1983; mod.)

Die in *E. coli* unter natürlichen Bedingungen nur geringe Fähigkeit zur Aufnahme von Fremd-DNA konnte künstlich durch eine Behandlung mit Calciumchlorid verstärkt werden. Dazu wurde wie folgt vorgegangen:

1. Ausplattieren des *E. coli* Akzeptorstammes (*E. coli* DH5α) aus einer -70 °C-Stammkultur auf LB-Agar und Anzucht ü. N. bei 37 °C
2. Überimpfen einer Einzelkolonie in 5 ml LB-Medium und Inkubation ü. N. bei 37 °C und 250 UpM
3. Animpfen von 100 ml LB-Medium mit 2 ml der Vorkultur, Inkubation bei 37 °C und 200 UpM bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,5
4. Abkühlen auf Eis (5 min) und Sedimentieren der Zellen mittels Zentrifugation (5 min, 5000 UpM, 4 °C)
5. Vorsichtiges Dekantieren des Überstandes und Suspendieren des Zellpellets in 30 ml TFB1-Puffer, Inkubation für 90 min auf Eis
6. Zentrifugation für 5 min bei 5000 UpM und 4 °C

7. Vorsichtiges Dekantieren des Überstandes und Suspendieren des Zellpellets in 4 ml eiskaltem TFB2-Puffer, Aliquotieren der Zellsuspension (100 µl) in sterile 1,5-ml-Reaktionsgefäße, Lagerung der Zellen bei -70 °C

Die Zentrifugationsschritte erfolgten in einer RC 5C Plus-Zentrifuge (Kendro).

TFB1			TFB2		
RbCl	100	mM	MOPS	10	mM
MnCl <sub>2</sub>	50	mM	RbCl	10	mM
Kaliumacetat	30	mM	CaCl <sub>2</sub>	75	mM
CaCl <sub>2</sub>	10	mM	Glycerin	15	% (v/v)
Glycerin	15	% (v/v)			
Der pH 5,8 wurde mit HCl eingestellt, die Lösung nach Sterilfiltration bei 4 °C gelagert.			Der pH 8,0 wurde mit KOH eingestellt, die Lösung nach Sterilfiltration bei 4 °C gelagert.		

## 2.9.2 Hitzeschock-Transformation CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli*

Die chemische Transformation von *E. coli* erfolgte durch Vereinigung der Ligationsansätze (2.8.7.3) mit *E. coli* DH5α-Zellen (2.9.1). Der Vorteil dieser Methode bestand in der relativen Unempfindlichkeit für hohe Salzkonzentrationen im Ligationsansatz und der Einsatzmöglichkeit großer Lösungs-Volumina. Die DNA-Lösung konnte somit unentsalzt eingesetzt werden und musste vorher keinem weiteren Konzentrationsschritt unterzogen werden. Es wurde folgendermaßen vorgegangen:

1. Vorsichtiges Auftauen von 100-µl-Aliquots CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli* Zellen auf Eis
2. Zugabe von 5 - 20 µl Ligationsansatz
3. Inkubation für 20 min auf Eis
4. Hitzeschock bei 42 °C für 90 s
5. Zugabe von 500 µl LB-Medium
6. Regeneration der Zellen im Thermomixer (Thermomixer 5436, Eppendorf) für 60 min bei 37 °C und 500 UpM
7. Ausplattieren von 20 µl, 50 µl und 100 µl des Transformationsansatzes im Doppelansatz auf LB-Medium mit den für die Selektion erforderlichen Zusätzen (2.3)
8. Inkubation der LB-Selektiv-Platten ü. N. bei 37 °C

### 2.9.3 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Die Methode der Elektroporation erfolgte prinzipiell nach Dower *et al.* (1988) unter Verwendung eines GenePulser<sup>TM</sup>II (Bio-Rad). Hierfür wurden die nachfolgend aufgeführten methodischen Schritte abgearbeitet:

1. Elektroporationsküvetten (0,2 cm Elektrodenabstand) bei -20 °C vorkühlen, anschließend auf Eis überführen
2. Auftauen elektrokompetenter Zellen auf Eis
3. Zugabe von 35 µl kompetenten Zellen zu 5 µl Ligationsansatz
4. Elektroporation: 25 µF, 200 Ω, 2,5 kV
5. Zugabe von 1 ml LB-Medium
6. Inkubation: 60 min, 37 °C
7. Ausplattieren von 10, 50, 100 µl des Transformationsansatzes auf Selektionsplatten
8. Inkubation ü. N. bei 37 °C

Eine erfolgreiche Transformation wurde durch Inokulation einer Einzelkolonie in 5 ml LB-Medium und anschließender Plasmidisolation (2.8.6.2) bestätigt.

### 2.10 Transformation von *C. acetobutylicum* durch Elektroporation

Die Transformation von *C. acetobutylicum* erfolgte im Wesentlichen nach Mermelstein *et al.* (1992). Es wurden stets frisch hergestellte elektrokompetente Zellen von *C. acetobutylicum* für eine Transformation verwendet. Die Elektroporation erfolgte anaerob in einer Anaerobenkammer (MACS-MG-500, Meintrup DWS). Aus einer exponentiell wachsenden Vorkultur wurden 80 ml CGM-Medium beimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 - 1,0 angezogen. Die Zellen wurden in Zentrifugenbecher (SS 34) überführt und durch eine Zentrifugation sedimentiert (5000 x g, 10 min, 4 °C). Anschließend wurden sie sofort in die Anaerobenkammer eingeschleust. Alle weiteren Schritte erfolgten zügig auf Eis. Die Zellen aus jeweils einem Zentrifugenbecher wurden zweimal mit 10 ml eiskaltem Elektroporationspuffer gewaschen. Die entsprechenden Zentrifugationen erfolgten bei 5000 x g für 10 min bei 4 °C. Dann wurde das Pellet in 1 ml eiskalten Elektroporationspuffer gelöst und pro Ansatz 400 µl Zellsuspension in eine Elektroporationsküvette (0,4 cm Elektrodenabstand) überführt und dort mit 500 ng - 10 µg der methylierten Plasmid-DNA (Mermelstein und Papoutsakis, 1993) versetzt. Es folgte eine fünfminutige Inkubation auf Eis, dann wurde die Küvette in den Schlitten des GenePulser<sup>TM</sup>II eingesetzt und der Strompuls ausgelöst (50 µF Kapazität, 600 Ω Widerstand, 1,8 kV Spannung). Es ergaben sich



Zeitkonstanten von 10,0 - 20,0 ms. Nach dem Strompuls wurden die Zellen direkt in ein mit 1 ml CGM befülltes, verschraubbares Reaktionsgefäß gegeben und vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurden Aliquots aus dem Ansatz auf selektive RCA-Nährböden (2.6) plattiert. Die Inkubation erfolgte für zwei Tage bei 37 °C in der Anaerobenkammer.

### Elektroporationspuffer

Saccharose (270 mM)		10	µl
Na-Phosphat-Puffer (pH 7,4)	ad	150	ml

### Na-Phosphat-Puffer (pH 7,4)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (200 mM)		22,6	ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (200 mM)		77,4	ml

## 2.11 Polyacrylamidgelelektrophorese

Für Polyacrylamidgelelektrophoresen wurden Mini-Gelkammern (Biometra) mit Gelen der Maße 8,6 x 7,7 x 0,1 cm (Breite x Länge x Dicke) verwendet.

### 2.11.1 SDS-PAGE (Laemmli, 1970; mod.)

Zur Herstellung der Gele wurden folgende Lösungen (in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>) verwendet:

#### 4x Trenngelpuffer

Tris-HCl (pH 8,8)	1,5	M
SDS	0,4	% (w/v)

#### 4x Sammelgelpuffer

Tris-HCl (pH 6,8)	0,5	M
SDS	0,4	% (w/v)

#### SDS-Probenpuffer

Glycerin	40	% (v/v)
DTE	40	mM
SDS	10	% (w/v)
Bromphenolblau	0,4	% (w/v)
Tris-HCl (pH 6,8)	250	mM

#### Ammoniumpersulfat-Lösung

10 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)

Aliquots wurden bei -20°C gelagert.

#### 10x SDS-Laufpuffer

Tris	0,25	M
Glycin	1,92	M
SDS	1	% (w/v)

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe wurde in der Regel ein Acrylamidgehalt von 12 % (v/v) verwendet. Zur Auftrennung besonders kleiner Proteine konnten auch höherprozentige Trenngele Verwendung finden (bis 25 %). Das Sammelgel war stets 4 %ig (v/v). Die Zusammensetzung der Gellösungen ist der Tabelle M6 zu entnehmen.

**Tab. M6: Gelzusammensetzung**

	<b>Trenngel (12 %)</b>		<b>Sammelgel (4 %)</b>	
Gel 40-Lösung (Roth)	2,35	ml	0,52	ml
4x Trenngelpuffer	1,88	ml	-	
4x Sammelgelpuffer	-		1,25	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	3,11	ml	3,12	ml
TEMED	10	µl	10	µl
APS (10 %, [w/v])	150	µl	100	µl

Zunächst wurde das Trenngel nach oben aufgeführtem Schema pipettiert und direkt nach Zugabe der APS-Lösung zwischen die mit Ethanol (70 % [v/v], vergällt) gereinigten und zusammengesetzten Glasplatten gegossen. Um eine gerade Gelkante zu erhalten, wurden die Gele mit Butanol (H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>-gesättigt) überschichtet. Das Butanol wurde nach dem Polymerisieren des Gels (ca. 30 min) mit Filterpapier abgenommen. In die noch flüssige Sammelgellösung erfolgte sofort nach Einfüllen zwischen die Glasplatten das Einsetzen des Kammes zur Taschenbildung. Verwendung fanden Kämme mit 5, 10 bzw. 20 Taschen, welche Volumina von 50 µl, 20 µl bzw. 10 µl aufnehmen konnten. Proteinproben wurden im Verhältnis 4:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt und kurz vor dem Auftragen auf das Gel für 5 min bei 100 °C denaturiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte bei einem konstanten Stromfluss von 10 mA (Sammelgel) bzw. 20 mA (Trenngel) pro Gel in 1x SDS-Laufpuffer bei RT bis die Lauffront das Gelende erreichte. Zur Größenbestimmung von Proteinen in der SDS-PAGE fand der „Prestained Protein Molecular Weight Marker“ (nur bei Gelen, die geblottet wurden) und der „Protein Molecular Weight Marker“ (Tab. M7; beide Fermentas) gemäß den Angaben des Herstellers Verwendung. Die Größenbestimmung der molekularen Massen von Proteinen in homogenen SDS-Gelen erfolgte anhand von Eichgeraden bestehend aus dem Logarithmus der Molekulargewichte der stets mitgeführten Markerproteine, der gegen ihren R<sub>f</sub>-Wert (R<sub>f</sub> = Laufstrecke des Proteins/Laufstrecke des Bromphenolblaus) aufgetragen wurde (Shapiro *et al.*, 1967).

**Tab. M7: Proteinstandards**

Prestained Protein	Molecular Weight Marker	Protein	Molecular Weight Marker
Protein	MW (kDa) <sup>1,2</sup>	Protein	MW (kDa) <sup>1</sup>
β-Galactosidase	120	β-Galactosidase	116
Rinderserumalbumin	86	Rinderserumalbumin	66,2
Ovalbumin	47	Ovalbumin	45
Carboanhydrase	34	Lactat Dehydrogenase	35
β-lactoglobulin	26	Restriktionsendonuklease <i>Bsp98I</i>	25
Lysozym	20	β-Lactoglobulin	18,4
		Lysozym	14,4

**1** Die angegebenen molekularen Massen entsprechen den Herstellerangaben; **2** Die Massenunterschiede entstehen durch den eingelagerten Farbstoff.

### 2.11.2 Native PAGE

Die native PAGE erfolgte nach Laemmli (1970, mod.) und unterschied sich von der SDS-PAGE (2.11.1) nur durch das Fehlen von SDS in Puffern und Gel. Eine Ausnahme bildete der native Probenpuffer, der aus 30 % (w/v) Saccharose und 0,02 % (w/v) Bromphenolblau in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> bestand. Die Zusammensetzung nativer Gele entsprach ebenfalls der in Tab. M6. Es wurde sowohl ein Trenngel (Acrylamidkonzentration 12 % [w/v]) als auch ein Sammelgel (Acrylamidkonzentration 4 % [w/v]) gegossen. Die Herstellung der Gele erfolgte wie in 2.11.1 beschrieben.

Die Proben wurden mit 0,25 Vol. des nativen Probenpuffers versetzt, gemischt und zur Entfernung möglicher Präzipitate für 2 min bei 12000 UpM und 4 °C zentrifugiert (Biofuge Fresco, Heraeus). Die ca. 6stündige Elektrophorese erfolgte bei RT und einer konstanten Stromstärke von 10 mA (Sammelgel) bzw. 20 mA (Trenngel).

Bei Gelen für Superoxid-Dismutase Zymogramme wurden dem Gelansatz für Trenn- sowie Sammelgel anstatt APS 10 µl Riboflavin (Vitamin B2, 1 µg/ml Stammlösung) zugegeben und die Gele unter Einwirkung einer 40-W-Glühbirne im Abstand von 25 cm vom Gel photopolymerisiert. Das Riboflavin diente der Bereitstellung von Superoxidionen direkt im Gel.

### 2.12 Proteinfärbung mit colloidalem Coomassie

Zur unspezifischen Färbung von Proteingelen wurde eine colloideale Coomassie-Färbung verwendet. Hierzu wurden die Gele in der Regel ü. N., mindestens aber für 2 Stunden, in Fixierer geschüttelt. Das Färben der Gele erfolgte für 24 – 48 Stunden bei RT unter ständigem Schütteln. Anschließend wurde die Färbelösung gegen H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> ausgetauscht und das Gel

solange darin geschwenkt, bis der Hintergrund ausreichend entfärbt war (ca. 3 h). Dabei erfolgte ein mehrfacher Wechsel des H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>.

### Stammlösung Coomassie

Coomassie Brilliant Blue G250 (Serva)	1	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ad	20	ml

### Färbelösung

ortho-Phosphorsäure	2	% (w/v)
Ammoniumsulfat	10	% (w/v)
Coomassie Brilliant Blue G250	0,1	% (w/v)
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ad	1000	ml

Die colloidale Coomassie-Färbelösung, die noch kein Methanol enthielt, war mehrere Wochen bei RT lagerfähig. Es ist ein Ausflocken des Farbstoffs zu beobachten. Dies ist normal und verschwindet nach gründlichem Mischen mit Methanol (96 %, reinst; Roth) (4:1) direkt vor dem Färben.

### Fixierlösung

Essigsäure	10	% (w/v)
Ethanol (96 %, reinst)	50	% (w/v)
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ad	1000	ml

## 2.13 Zielgerichtete Mutagenese von *C. acetobutylicum* mittels „ClosTron System“

Infolge der Entschlüsselung des Integrationsmechanismus des *Lactococcus lactis* LtrB-Introns (Ll.LtrB) in das Zielgen *ltrB* in der Arbeitsgruppe um Lambowitz und Studien zu einer möglichen Veränderung der Spezifität dieses Introns (Mohr *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 2003), wurde eine Verwendung dieses Mechanismus zum gezielten Knockout von Genen auch in anderen Organismen möglich (Perutka *et al.*, 2004). Dieses System ist durch den „Targetron® Gene-Knockout Kit“ kommerziell bei Sigma ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)) erhältlich. Die methodische Anpassung an die Erfordernisse an einen Knockout von Genen bei Clostridien erfolgte durch Heap *et al.* (2007).

### 2.13.1 Auswahl von Insertionsorten

Mögliche Zielsequenzen für die Insertion des Guppe-II-Introns in das gewünschte Gen und die zur Anpassung der intronkodierte Erkennungssequenz notwendigen Primer wurden unter Verwendung eines durch Perutka *et al.* (2004) generierten Computer-Algorithmus bestimmt, welcher auf der Seite von Sigma-Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com>) zur Verfügung stand. Die Verwendung dieses Algorithmus konnte mittels eines im Targetron® Gene-Knockout Kit (Sigma-Aldrich) enthaltenen Freischaltungscode legitimiert werden.

### 2.13.2 Splicing by overlap extension (SOE) PCR

Zur Amplifikation eines 350-Bp-PCR-Fragmentes, welches die für das „Re-Targeting“ des Introns notwendigen modifizierten IBS, EBS1d und EBS2 Sequenzen enthielt, fand die SOE- (splicing by overlap extension) PCR nach Ho *et al.* (1989) Verwendung. Diese Reaktion ermöglicht die gezielte Basensubstitution einer DNA-Sequenz resultierend in einer zielgerichteten Veränderung der Matrize durch eine primervermittelte Mutation.

Die Reaktion unter Einsatz von 4 Primern erfolgte in nur einem Ansatz. Es wurden die drei an das Zielgen angepassten Primer (IBS, EBS2, EBS1d) und ein unveränderter Primer (EBS Universal) gemeinsam in der gleichen PCR eingesetzt. Die weiteren notwendigen Komponenten waren in einem fertigen Mix („JumpStart RedTaq Ready Mix“) im Targetron Gene-Knockout Kit enthalten. Zunächst wurden die Oligonukleotide nach vorheriger Verdünnung zu einem Gemisch vereinigt. Der Verdünnungsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

IBS Primer (100 µM)	2	µl
EBS1d Primer (100 µM)	2	µl
EBS2 Primer (20 µM)	2	µl
EBS Universal (20 µM)	2	µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ad	20	µl

Im Anschluss wurde dieser Vier-Primer-Mix für die SOE-PCR verwendet. Der eigentliche Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

JumpStart RedTaq Ready Mix	25	µl
Vier-Primer-Mix	1	µl
Intron-PCR-Template (1:10 verd.)	1	µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ad	50	µl

Die Hybridisierung während der PCR erfolgte einheitlich bei 55 °C nach folgenden Schritten:

Denaturierung	94 °C	30 sec	1 x
Denaturierung	94 °C	15 sec	} 30 x
Annealing	55 °C	30 sec	
Amplifikation	72 °C	30 sec	
Abschlussynthese	72 °C	2 min	1 x
Lagerung	4 °C	∞ unendlich	

Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel (2.8.5) analysiert, weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert. Als DNA-Matrize für die PCR konnte Intron-DNA aus dem Targetron Gene-Knockout Kit oder das pMTL007-Plasmid verwendet werden.

### 2.13.3 Integration des Gruppe-II-Introns

Die Induktion der Gruppe-II-Intron Expression wurde mittels IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactosid, Roth), welches den *fac*-Promotor aktiviert, ausgelöst (Heap *et al.*, 2007). Dazu wurde zunächst eine Kolonie von plasmidtragenden *C. acetobutylicum* Zellen in ein Hungate-Röhrchen mit 10 ml frischem CGM-Medium (2.2.1), versetzt mit 15 µg/ml Thiamphenicol, überimpft und ü. N. bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Es wurden 100 µl dieser ü. N. gewachsenen Kultur der Transformanten in 1 ml frisches CGM mit 7,5 µg/ml Thiamphenicol überführt. Die Kultur wurde anschließend 1 h bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen inkubiert, bis beginnende Gasbildung zu beobachten war. Dies deutete darauf hin, dass die Kultur angewachsen war. Die Induktion wurde durch Zugabe von 10 µl IPTG (10 mM) zum Reaktionsansatz ausgelöst und die Zellen ein bis drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen pelletiert und der Überstand dekantiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit 500 µl PBS-Puffer. Die notwendigen Zentrifugationen wurden in der Haereus Biofuge Fresco bei 5000 Upm für 1 min bei 4 °C vorgenommen. Nun wurde das Zellsediment in 1 ml CGM resuspendiert und wiederholt ein bis drei Stunden bei 37 °C bebrütet. Abschließend wurden Aliquots der wachsenden Kultur auf RCA-Nährböden (2.6) mit Erythromycin ausplattiert.

Bei Verwendung von Derivaten des Plasmids pMTL007C-E2 war keine Induktion der Intron Expression notwendig. Die plasmidtragende Kultur wurde überimpft in CGM, versetzt mit 7,5 µg/ml Thiamphenicol. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 1,0 – 1,5 wurde erneut überimpft. Nach 3 Überimpfungen wurden Aliquots der Kultur auf RCA-Nährböden mit Erythromycin ausplattiert, um auf die intronvermittelte Resistenz zu selektieren.

**PBS-Puffer**

KCl		0,2	g
NaCl		8	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		1,44	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0,24	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	100	ml

Der pH-Wert von 7,2 wurde mit konzentrierter HCl eingestellt.

**2.14 Zellernte und Zellaufschluss****2.14.1 Schneller Aufschluss für die SDS-PAGE**

Zur Gewinnung von komplexen Rohextrakten von *E. coli*, welche ausschließlich zur Analyse auf SDS-Polyacrylamidgelen vorgesehen waren, wurden 1-ml-Zellsuspensionen (bekannter OD) zunächst durch einminütige Zentrifugation bei 5000 UpM und 4 °C (Biofuge Fresco, Heraeus) gewonnen. Das Pellet konnte nach dem Dekantieren des Überstandes in 40 – 250 µl SDS-Probenpuffer (2.11.1) aufgenommen werden. Das Volumen richtete sich nach der Eingangs-OD der Zellsuspension, eine OD<sub>600</sub> von 0,5 entsprach einem Probenpuffervolumen von 50 µl. Es folgte die vollständige Suspension des Sedimentes (Vortex Gene-2, Fisher) und eine gelelektrophoretische Analyse von 10 µl bis 15 µl der Suspension (2.11)

**2.14.2 Herstellung geklärter Lysate für *Strep*-Tactin-Sepharose**

Zur Herstellung geklärter Lysate für die spätere Aufreinigung von *Strep*-TagII-Fusionsproteinen wurden 500 ml Zellkultur auf 250-ml-Zentrifugenbecher aufgeteilt und für 10 min bei 4500 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 5 ml Puffer W<sub>oE</sub> (2.15) suspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte mittels Ultraschall (Ultraschall Desintegrator Sonopuls HD60, MedLab) unter Verwendung der Spitze MS 64 in 15-ml-Rotdeckelröhrchen. Die Beschallung erfolgte für zweimal 1 min mit 1,5 min Pause unter Kühlung auf Eis. Der Aufschluss von *C. acetobutylicum* Zellen erfolgte durch fünfmalige Beschallung für 1 min und jeweils 1,5 min Pause. Die Leistung entsprach 70 % bei 80 Pulsen pro Minute. Zelltrümmer wurden durch anschließende Zentrifugation (Tischkühlzentrifuge 3K 30, Sigma) für 30 min bei 10000 x g und 4 °C entfernt. Der so geklärte Überstand konnte direkt für die Aufreinigung mittels Säulenchromatographie an *Strep*-Tactin-Sepharose eingesetzt werden (2.15.1).

## 2.15 Protein-Standardmethoden

### 2.15.1 Affinitätschromatographie an *Strep*-Tactin-Sepharose

Die native Aufreinigung von *Strep*-TagII-Fusionsproteinen erfolgte mittels Affinitätschromatographie an *Strep*-Tactin-Sepharose (IBA). Damit die Säule das geforderte Bettvolumen von 1 ml enthielt, mussten zunächst 2 ml (50 %, [w/v]) *Strep*-Tactin-Sepharose-Suspension in eine leere Säule (Poly-Prep Chromatography Columns, BioRad) gefüllt werden. Nach Absetzen des Säulenmaterials wurde die überstehende Flüssigkeit abgelassen, die Säule mit 2 ml Puffer W<sub>oE</sub> äquilibriert und anschließend das geklärte Lysat (2.14.2) auf die Säule gegeben. In dieser Arbeit wurde die Abwandlung W<sub>oE</sub> (Puffer W ohne EDTA) des sonst üblichen Puffers W verwendet, da das in Puffer W enthaltene EDTA durch Komplexierung der für die Funktion des zu reinigenden Proteins notwendigen Metall-Ionen einen Funktionsverlust des Proteins bewirken würde. Nachdem der Durchfluss die Säule passiert hatte, wurde diese fünfmal mit 1 ml Puffer W<sub>oE</sub> gewaschen und die jeweiligen Fraktionen gesammelt. Die Elution erfolgte durch sechsmalige Zugabe von 0,5 ml Puffer E<sub>oE</sub> und Auffangen jeder dieser Fraktionen in sterilen 1,5-ml-Reaktionsgefäßen. Das gereinigte *Step*-TagII-Fusionsprotein war in den Elutionsfraktionen 3 bis 5 zu erwarten. Eine Regeneration der Säule erfolgte durch dreimaliges Waschen mit je 5 ml Puffer R. Der Farbwechsel von gelb nach rot zeigte den Verlauf des Regenerationsprozesses und die Intensität der Rotfärbung den Aktivitätsstatus der Säule an. Puffer R konnte durch zwei- bis mehrmalige Zugabe von 4 ml Puffer W<sub>oE</sub> entfernt werden (Farbumschlag nach weiß). Anschließend wurde die Säule mit 2 ml Lagerungspuffer überschichtet und bei 4 °C aufbewahrt. Die aufgereinigten *Step*-TagII-Fusionsproteine wurden bei -20 °C gelagert. Eine Überprüfung der erfolgreichen Aufreinigung erfolgte einerseits durch Konzentrationsbestimmung nach Bradford (1976; 2.15.2), andererseits durch Aufnahme von je 20 µl der gewonnenen Elutionsfraktionen in 20 µl SDS-Probenpuffer und die anschließende SDS-PAGE (2.11.1).

#### **Puffer W** (Äquilibrierungs- und Waschpuffer)

Tris-HCl (pH 8,0)	100	mM
EDTA (0,5 M EDTA, pH 8,0, ultrapure; Gibco)	1	mM
NaCl	150	mM

#### **Puffer E<sub>oE</sub>** (Elutionspuffer)

Puffer W <sub>oE</sub> + 2,5 mM
Desthiobiotin (Sigma)



**Lagerungspuffer**

Tris-HCl (pH 8,0)	100	mM
EDTA (0,5 M EDTA, pH 8,0, ultrapure; Gibco)	1	mM
NaN <sub>3</sub>	0,02	% (w/v)

**Puffer R ( Regenerationspuffer)**

Puffer W + 1 mM HABA

**Puffer W<sub>0E</sub> (ohne EDTA) (Äquilibrations- und Waschpuffer)**

Tris-HCl (pH 8,0)	100	mM
NaCl	150	mM

**2.15.2 Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford (1976, mod.)**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in wässrigen Lösungen wurden diese 1:50 bzw. 1:100 mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> verdünnt. Von den Verdünnungen wurden 50 µl mit 950 µl Bradford-Reagenz versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm in Plastikküvetten (Schichtdicke 1 cm) in einem Ultrospec 3000 Spektralphotometer (Amersham) gegen den entsprechenden Blindwert (50 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> + 950 µl Bradford-Reagenz). Anhand einer mittels BSA (Albumin Fraktion V, Roth) erstellten Eichreihe konnte die Konzentration des Proteins in der Lösung errechnet werden.

**Bradford-Reagenz**

Serva-Blue G250	70	mg	0,082	mM
Ethanol (96 % [v/v], reinst)	50	ml	5	% (v/v)
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (85 % [v/v])	100	ml	10	% (v/v)
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ad	100	ml		

Das Reagenz wurde lichtgeschützt bei RT gelagert.

**2.15.3 Spektrometrische Charakterisierung von Proteinen**

Lösungen von affinitätschromatographisch gereinigten Proteinen (2.15.1) konnten zur Untersuchung der spektralen Eigenschaften direkt unverdünnt eingesetzt werden. Die Aufzeichnung der Spektren erfolgte in einem Ultrospec 3000 (Amersham) gegen einen Blindwert des entsprechenden Puffers in 400-µl-Quarzküvetten.

Die Redox titration von oxidiertem, frisch isoliertem revRbr erfolgte in einem Reaktionspuffer aus 50 mM MOPS, pH 7,0 versetzt mit 0,1 mM EDTA. Frisch isoliertes revRbr (2.15.1) wurde mit einer Endkonzentration von 100 µM (2.15.2) eingesetzt und mit 125 µM NADH versetzt. Anschließend wurden weitere Proteine (Rd, NROR oder FNR) in einer

Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  hinzugegeben. Das Absorptionsspektrum der Lösung wurde jeweils nach Zugabe einer neuen Komponente erfasst.

Für einen Nachweis einer Oxidation des revRbr durch  $\text{H}_2\text{O}_2$ , wurde gereinigtes revRbr (100  $\mu\text{M}$ ) zunächst durch Zugabe einer äquimolaren Menge Na-Dithionit reduziert. Diese Experimente mussten unter Ausschluss von Sauerstoff in der Anaerobenkammer (MACS-MG-500, Meintrup DWS) erfolgen. Zur Aufnahme des Spektrums wurde die Quarzküvette mit Parafilm versiegelt und zügig in das Photometer überführt. Die Zugabe weiterer Proteinkomponenten (je 1  $\mu\text{M}$ ) und von  $\text{H}_2\text{O}_2$  erfolgte anschließend wieder in der Anaerobenkammer.

#### **2.15.4 Größenbestimmung von Proteinen mittels FPLC**

Die Molekulargewichte nativer Proteine wurden mittels Gelfiltration bestimmt (FPLC = fast pressure liquid chromatography). Verwendung fand eine Superose 12 10/300 Säule (GE Healthcare). Als mobile Phase diente ein Puffer aus 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 mM EDTA und 150 mM NaCl. Die Säule wurde zunächst mit 60 ml Laufpuffer bei einer Durchflussrate von 1 ml/min gewaschen, bevor 1 mg des zu untersuchenden Proteins oder Proteingemisches in einem Volumen von 1 ml auf die Säule appliziert wurde. Die Trennung im Gel erfolgte zunächst für 2 h mit einer Durchflussrate von 0,5 ml/min, anschließend wurde die Flussrate für 60 min auf 1 ml/min erhöht, um Proteinrückstände von der Säule zu waschen. Die Aufzeichnung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch über die Absorption bei 280 nm. Das zur Elution der Proteine benötigte Puffervolumen konnte mit vorher bestimmten Werten für Proteine bekannter Größe (Kalibrierungsgemisch: Aldolase, 158 kDa; Albumin, 67 kDa; Ovalbumin, 43 kDa; Chymotrypsinogen, 25 kDa; [LMW-gel filtration calibration kit], Amersham) ins Verhältnis gesetzt werden. Große Proteine eluierten dabei schneller von der Säule als kleine.

#### **2.15.5 Transfer von Proteinen auf Membranen (Western-Blot) (Towbin *et al.*, 1979; mod.)**

Der Western-Blot ermöglicht die Übertragung von Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran, auf welcher sie weiteren Detektionsverfahren leichter zugänglich sind als im Gel. Zunächst wurden 15  $\mu\text{l}$  Gesamtproteinextrakt einer Zellkultur bzw. ca. 4  $\mu\text{g}$  aufgereinigtes Protein (2.15.1, 2.15.2) in einer SDS-PAGE aufgetrennt (2.11.1). Als Referenz zur späteren Größenbestimmung diente der Prestained Protein Molecular Weight Marker (Tab. M7, Fermentas). Der Western-Blot erfolgte in einer Semi-Dry Fast-Blot Apparatur (Typ B31, Biometra). Pro Gel wurden 6 Lagen Whatman Chromatographiepapier

(2 mm, Whatman) sowie eine Nitrocellulosemembran (0,2  $\mu\text{m}$ , Biometra) auf Gelgröße zugeschnitten und kurz in Transferpuffer eingelegt. Dieser enthielt 20 % Ethanol ([v/v], reinst), welcher zum einen die Proteinbindungsstellen der Nitrocellulosemembran aktiviert und zum anderen einen schnelleren und effizienteren Proteintransfer vom Gel auf die Membran gewährleistet. Der Blot wurde in folgender Reihenfolge luftblasenfrei auf der Anodenplatte aufgebaut: 3 x Whatman Chromatographiepapier, Nitrocellulosemembran, SDS-Gel (12 %ig), 3 x Whatman Chromatographiepapier. Überschüssiger Puffer wurde mit saugfähigem Papier, Luftblasen durch Abrollen eines Reagenzglases auf dem Blot entfernt. Anschließend wurde die Apparatur durch Auflegen der Kathodenplatte unter leichtem Druck geschlossen und der Transfer bei einer konstanten Stromstärke von 5  $\text{mA}/\text{cm}^2$  Membran durchgeführt, bis die Spannung auf die Hälfte des Ausgangswertes gesunken war. Es schloss sich die Coomassie-Färbung des SDS-Gels an (2.12).

### Transferpuffer

Tris	15,14	g	125	mM
Glycin	14,40	g	192	mM
Ethanol (96 % [v/v], reinst)	200	ml	20	% (v/v)
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ad	1000	ml		

Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

### 2.15.6 ST-AP-Detektion von *Strep*-TagII-Fusionsproteinen

Die ST-AP-Detektion diente dem direkten Nachweis von *Strep*-TagII-Proteinen. Im Anschluss an den Western-Blot (2.15.5) wurden die Membranen mit 20 ml 3 % (w/v) BSA (Albumin Fraktion V, Roth), 0,5 % (v/v) Tween in PBS-Puffer („Blocking Reagenz“) für 1 h bei RT unter leichtem Schwenken bzw. ü. N. bei 4 °C (kein Schütteln) geblockt. Anschließend wurde die Membran dreimal für jeweils 5 min mit PBS-Tween-Puffer (PBS mit 0,1 % Tween 20) gewaschen. Vor der Detektion des rekombinanten Proteins anhand des *Strep*-TagII erfolgte eine 10minütige Inkubation der Membran unter leichtem Schütteln (Celloshaker, Renner) in 10 ml PBS-Tween-Puffer versetzt mit 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Avidin aus Hühnereiweiß. Ziel war es, das endogene Biotin Carboxyl Carrier Protein (BCCP, 22 kDa) aus *E. coli* spezifisch zu blocken (Schmidt und Skerra, 1993). Es folgte die Zugabe von 2,5  $\mu\text{l}$  *Strep*-Tactin alkaline phosphatase conjugate (ST-AP, IBA) sowie eine 60minütige Inkubation unter leichtem Schwenken. Die Membran wurde nun für jeweils eine Minute zweimal mit PBS-Tween- und zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Die Initiation der Farbreaktion erfolgte in 20 ml Reaktionspuffer unter Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  7,5 % (w/v) Nitroblautetrazoliumchlorid

(NBT) gelöst in 70 % (v/v) Dimethylformamide (DMF) und 60 µl 5 % (w/v) 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (BCIP) gelöst in DMF. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch mehrmaliges Waschen der Membran mit destilliertem Wasser. Die Membran konnte nach dem Einschweißen in Plastikfolie bei 4 °C im Dunkeln gelagert werden.

#### **PBS-Puffer**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,54	g	4	mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,85	g	16	mM
NaCl	6,72	g	115	mM
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	1000	ml	

Das Einstellen von pH 8,0 erfolgte mit 0,1 M HCl.

#### **Reaktionspuffer**

NaCl	0,58	g	100	mM
MgCl <sub>2</sub>	0,1	g	5	mM
Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8)	6,67	ml	100	mM
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	100	ml	

### **2.16 Messung von Sauerstoffverbrauch in *C. acetobutylicum* Kulturen oder Proteingemischen** (Warkentin *et al.*, 2007)

Der Sauerstoffgehalt von Lösungen oder Zellkulturen konnte mit Hilfe eines Fibox 3 - Single Channel Fiber-optic Oxygen Meter (PreSens) kontinuierlich bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) bestimmt werden. Die Puffer und Reaktionsbedingungen zur Bestimmung des Sauerstoffkonsums in Proteinlösungen entsprachen denen für den NAD(P)H-Oxidase Test (2.17.2.3). Die Zugabe der Proteinkomponenten (Rd und NROR bzw. FNR [Sigma]) erfolgte in 2-min-Intervallen, wobei revRbr als letztes zugesetzt wurde. Das Reaktionsvolumen war 4 ml. In einigen Fällen wurden dem Ansatz 0,3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unmittelbar vor Zugabe von revRbr zugesetzt.

Zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs von Zellkulturen wurden 10-ml-Kulturen in CGM-Medium bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 angezogen. Direkt vor dem Start des Experiments wurde ein 450-µl-Aliquot der Kultur mit 50 µl 37 %igem Formaldehyd versetzt und zur Bestimmung der Zellzahl bei -20 °C gelagert. 4,5 ml der Zellkultur wurden anschließend in einem 15-ml-Rotdeckelröhrchen für 5 min mit 130 ml/min Luft begast. Die sauerstoffgesättigte Zellsuspension wurde anschließend in eine Makroküvette aus optischem Spezialglas überführt (1 cm Kantenlänge, 4,0 ml Volumen; Roth), bevor die Küvette mit

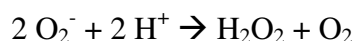
einem PTFE-Stopfen verschlossen wurde. Die Messung der Sauerstoffkonzentration in der verschlossenen Küvette erfolgte über 15 – 20 min und konnte mit Hilfe der Software OxyView 3.51 (PreSens) aufgezeichnet werden. Die Verbrauchsdaten wurden dann als  $\text{fmol h}^{-1} \text{Zelle}^{-1}$  berechnet.

## 2.17 Enzymassays

Zur Aufklärung der Funktion von reversen Rubrerythrin konnten zwei verschiedene Wege gegangen werden. Zum einen war die Darstellung von Enzymaktivitäten in Gelen aufgrund spezieller Färbemethoden möglich (Zymogramme), zum anderen konnten dafür optisch-enzymatische Tests herangezogen werden.

### 2.17.1 Superoxid-Dismutase Zymogramm (Beauchamp und Fridovich, 1971; mod.)

Die Superoxid-Dismutase (SOD) katalysiert die Reaktion:



Zur Darstellung von Superoxid-Dismutase Aktivität (SOD) wurden native Gele verwendet, welche mit Riboflavin anstatt mit APS versetzt und anschließend photopolymerisiert wurden (2.11.2). Der Test beruht auf dem Einsatz von Puffern mit Farbstoffen (Riboflavin), die bei Belichtung und Vorhandensein von N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und  $\text{O}_2$  Superoxid-Ionen bilden, welche wiederum NBT photoreduzieren. Diese Photoreduktion wird durch Superoxid-Dismutasen inhibiert. Nach der nativen Auftrennung der Proteine (2.11.2) wurden die Gele zunächst in NBT-Färbelösung (2,45 mM NBT in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ ) für 20 min, anschließend für 15 min mit Riboflavin-Lösung dunkel bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Abschließend erfolgte das Entwickeln der Gele unter Einwirkung einer 40-W-Glühbirne im Abstand von 25 cm.

#### Riboflavin-Lösung

TEMED	163	$\mu\text{l}$	28	mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5	g	36	mM
Riboflavin	0,53	mg	28	$\mu\text{M}$
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	ad	50	ml	

Die Lösung wurde mit HCl auf pH 7,8 eingestellt.

## 2.17.2 Optisch-enzymatische (*in vitro*) Tests

### 2.17.2.1 NBT-Test zum Nachweis von SOD-Aktivität

Die Umsetzung von NBT zu dem Farbstoff NBT-Diformazan durch Superoxid-Dismutasen konnte in einem optisch-enzymatischen Test zum Nachweis von SOD-Aktivität genutzt werden (Beauchamp und Fridovich, 1971). Der Reaktionspuffer aus 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,8 enthielt 0,2 mM NBT und 0,5 mM Xanthin. Für den SOD-Test wurden dem Reaktionsansatz in einer 400- $\mu\text{l}$ -Quarzküvette verschiedene Konzentrationen der zu untersuchenden gereinigten Proteine (Dfx und revRbr) zugesetzt. Nach Zugabe dieser Proteine erfolgte der Start der Reaktion durch Zugabe von Xanthin Oxidase (3,5  $\mu\text{g/ml}$ ). Erst danach wurden die notwendigen Superoxid-Ionen im Ansatz produziert.

Die Aktivität wurde als Verringerung des Anstiegs der Absorption bei 560 nm im Vergleich zu einer Probe ohne das zu untersuchende Protein in einem Ultrospec 3000 Spektralphotometer (Amersham) gemessen. 1 U SOD-Aktivität wurde definiert als die Proteinkonzentration, welche eine Verringerung des Anstiegs um die Hälfte verursacht. *E. coli* SOD (Sigma) wurde als Kontrolle für die Funktionalität des Tests verwendet.

### 2.17.2.2 Nachweis von SOD/SOR-Aktivität mit Cytochrom C

Zum Nachweis von Superoxid-Reduktase Aktivität des Dfx konnte ein ursprünglich für die Messung von SOD-Aktivität entwickelter Cytochrom C-abhängiger Test verwendet werden (Jenney *et al.*, 1999). Aufgrund seiner ambivalenten Eigenschaft entweder als Oxidationsmittel oder Reduktionsmittel zu wirken, kann Superoxid Cytochrom C reduzieren (dazu ist kein Enzym notwendig) oder oxidieren (unter Mitwirkung einer Superoxid-Reduktase). Die Reduktion von Cytochrom C verursacht eine Zunahme der Absorption bei 550 nm. Die Hemmung dieser Reaktion bei Entzug der Superoxid-Ionen durch die SOD-Reaktion kann zum Nachweis von SOD-Aktivität genutzt werden (ähnlich dem NBT-Test, vgl. 2.17.2.1). Wenn Superoxid-Reduktase Aktivität vorhanden ist, wird nicht nur die Reduktion durch Verbrauch der Superoxid-Ionen gehemmt, sondern zusätzlich wird das Superoxid direkt zur Oxidation von Cytochrom C genutzt, resultierend in einer sinkenden Absorption bei 550 nm.

Die Reaktion wurde in 400- $\mu\text{l}$ -Quarzküvetten unter aeroben Bedingungen in einem Puffer aus 100 mM Tris-HCl und 150 mM NaCl bei pH 8,0 durchgeführt und photometrisch in einem Ultrospec 3000 Spektralphotometer (Amersham) verfolgt. Der Sauerstoff in der Lösung war notwendig für die Generation von Superoxid durch die Xanthin/Xanthin Oxidase Reaktion. Cytochrom C (CytC, 20  $\mu\text{M}$ ) wurde in aeroben Lösungen autoreduziert, wodurch die

Absorption bei 550 nm leicht anstieg. Die Produktion von Superoxid-Ionen durch Zugabe von Xanthin (0,2 mM) und Xanthin Oxidase (3,5 µg/ml) zum Reaktionsansatz verstärkte diesen Effekt erheblich. Als Kontrolle für die Funktionalität des Testansatzes diente *E. coli* SOD. Die Enzyme (*E. coli* SOD [Sigma] oder Dfx) wurden in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt (0, 0,025, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5, und 10 µM). 1 U SOD-Aktivität wurde definiert als die Menge an SOD, welche 50 % Inhibition der Reduktion von CytC unter Superoxidbildung verursacht.

### 2.17.2.3 Nachweis des NAD(P)H-Verbrauchs verschiedener Reaktionen

Zur Überprüfung einer NADH-Peroxidase Aktivität, wie sie im alternativen Weg zur Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies angenommen wird (Lumppio *et al.*, 2001), fand hier ein direkter Test Anwendung. Die Umwandlung von NAD(P)H + H<sup>+</sup> zu NAD(P)<sup>+</sup> unter Einwirkung von Peroxidase und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{NAD(P)}^+ + 2 \text{H}_2\text{O}$ ) kann durch eine Extinktionsabnahme bei 340 nm ( $\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) verfolgt werden.

Dieser Test beruht im Wesentlichen auf einer von Coulter und Kurtz (2001) beschriebenen Methode. Dabei werden *C. acetobutylicum* NROR oder ersatzweise Ferredoxin:NADP<sup>+</sup> Reduktase (FNR, Sigma) aus Spinat in Verbindung mit Rd als Elektronendonoren für revRbr, RubY oder Dfx verwendet. Es konnte bei weglassen von Rd die Fähigkeit zur direkten Interaktion von NROR bzw. FNR mit revRbr, RubY oder Dfx getestet werden. In früheren Arbeiten wurde bereits eine Interaktion von NROR bzw. FNR mit Rd gezeigt (Grunden *et al.*, 2005; Lumppio *et al.*, 2001; Coulter und Kurtz, 2001).

Die Messung erfolgte entweder unter Einsatz von NADH (mit NROR) oder NAD(P)H (mit FNR) bei RT in 400-µl-Quarzküvetten in einem Ultrospec 3000 Spektralphotometer (Amersham). Der Reaktionsansatz enthielt 0,1 mM NAD(P)H, 1 µM FNR oder NROR in 50 mM MOPS und 0,1 mM EDTA bei pH 7,0. Nach jeweils 30 sec wurden weitere Proteinkomponenten mit einer Konzentration von 1 µM zugesetzt. Zur Bestimmung von Umsatzraten wurden in einigen Fällen die Konzentrationen einer der eingesetzten Proteinkomponenten bei gleichbleibender Konzentration der anderen Bestandteile verändert.

Zum Test einer NAD(P)H-Peroxidase Aktivität mussten alle Komponenten anaerob sein. Dies wurde durch Lagerung von Puffern und Lösungen in der Anaerobenkammer erreicht. Die Messung der NAD(P)H-Peroxidase Aktivität von revRbr bzw. RubY wurde durch Zugabe von 0,25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (anaerob) gestartet. Die Küvette wurde zur Messung in der Box mit Parafilm versiegelt und in das Photometer überführt.

Die Messung der NADH-Oxidase Aktivität erfolgte unter aeroben Bedingungen in sauerstoffsättigtem Puffer ohne Zusatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

SOR-Aktivität von Dfx wurde unter Verwendung des gleichen Tests gemessen, wobei hier dem Puffer zusätzlich zu den oben erwähnten Komponenten 0,5 mM Xanthin und 200 U/ml Katalase zugesetzt wurden. Die Reaktion wurde durch Produktion von Superoxid-Ionen im Ansatz nach der Zugabe von 3,5 µg/ml Xanthin Oxidase gestartet.

#### 2.17.2.4 Nachweis von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konsum/Bildung

In Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert die Meerettich Peroxidase (HRP) 10-Acetyl-3,7-Dihydroxyphenoxazin (Amplex Red [AR], Synchem OHG) zum Farbstoff Resorufin. Die hier verwendete Vorgehensweise wurde aus einem von Seaver und Imlay (2001) beschriebenen Verfahren abgeleitet. 100 µl einer 0,2 mM AR Stammlösung in 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Puffer (pH 7,8) wurden einem Probenansatz von 250 µl zugesetzt.

Zur Messung eines H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konsums erfolgte die Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch die Glukose/Glukose Oxidase Reaktion wie von Smith *et al.* (1974) beschrieben. Die Entstehung des farbigen Resorufins konnte photometrisch bei 560 nm verfolgt werden.

Der Probenansatz enthielt 200 µl 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,0) versetzt mit 2 µg/ml Glukose Oxidase, 0,1 mM NADPH und 1 µM FNR (Sigma).

Nach 30 sec wurden 10 µl einer 0,2 mg/ml HRP Stammlösung in einem Puffer aus 50 mM MOPS und 0,1 mM EDTA (pH 7,0) zugegeben. HRP verursachte dabei einen geringen kontinuierlichen Anstieg der Absorption. Nach weiteren 30 sec wurde 1 µM Rd zugesetzt. RevRbr wurde anschließend in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Zum Start der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion im Ansatz wurden 10 µl/ml einer Glukose Stammlösung aus 0,15 M Glukose, 0,1 M NH<sub>4</sub>Cl und 0,1 M CaCl<sub>2</sub> zum Reaktionsansatz gegeben. In einigen Fällen wurde revRbr erst im Anschluss an den Glukosezusatz hinzugefügt. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Verbrauch durch die Peroxidase Reaktion wurde als Abnahme der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion und infolge dessen einer geringeren Bildung des bei 560 nm absorbierenden Farbstoffes Resorufin sichtbar.

Zur Messung einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung durch die Superoxid-Reduktase Aktivität von Dfx wurde dem Probenansatz anstatt der Glukose Oxidase (s. o.) 0,5 mM Xanthin zugesetzt. Anschließend wurden alle 30 sec die Proteinkomponenten (FNR, Rd und Dfx; je 1 µM) zugegeben. Die Bildung von Superoxid-Ionen durch Zugabe von 3,5 µg/ml Xanthin Oxidase startete die SOR-Reaktion. In einigen Fällen wurde der Einfluss von *E. coli* SOD auf die Reaktionen getestet.



### 2.17.3 Messung der O<sub>2</sub>- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Toleranz verschiedener *C. acetobutylicum* Stämme (*in vivo*)

Eine *C. acetobutylicum* 10-ml-Kultur (2.5) wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> 0,8 – 1,0 bei 37 °C in CGM angezogen. Das Medium für *C. acetobutylicum* Überexpressionsstämme und Defektmutanten enthielt zusätzlich 20 mg/ml Erythromycin um einen Plasmidverlust bzw. Kontaminationen zu verhindern. Zur Überprüfung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Toleranz wurden 1-ml-Aliquots der zu überprüfenden Kultur in Eppendorfgefäße in der Anaerobenkammer mit 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unterschiedlicher Konzentrationen (0,125, 0,25, 0,375, 0,5, 0,625, 0,75, 0,875, 1,0 mM) für 30 min inkubiert. Einem Aliquot wurden als Referenz nur 50 µl 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 zugesetzt. Nach Ablauf der 30 min wurden Verdünnungen in frischem CGM angefertigt (10<sup>-1</sup> – 10<sup>-5</sup>) und 25 µl dieser Verdünnungen auf RCA-Platten (2.6) ausgespatelt. Nach einer Inkubation von 2 Tagen konnte durch Auszählen der Kolonie bildenden Einheiten (KBE) die Überlebensraten der gestressten Proben im Vergleich zur Referenz des gleichen Stamms bestimmt werden.

Zur Messung der Sauerstofftoleranz wurde ebenfalls ein 1-ml-Aliquot der Kultur in der Anaerobenkammer bei 37 °C als Referenz inkubiert. Der Rest der Kultur wurde für 15 min mit Druckluft (130 ml/min) begast. Nach einer weiteren 15minütigen Inkubation in der Anaerobenbox wurde genau wie für den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Test (s. o.) eine Verdünnungsreihe angesetzt. 10 µl der Proben wurden auf die Platten in 2 Reihen aufgetropft (ca. 5 µl pro Tropfen), wobei die gestresste und die ungestresste Probe so auf die gleiche Platte gespottet wurden, dass sich die jeweils gleichen Verdünnungsstufen gegenüberlagern. Auf diese Weise konnte der Einfluss der Sauerstoffbegasung sehr gut abgeschätzt und dokumentiert werden. Die Anzahl der Kolonien der letzten beiden Verdünnungsstufen wurde für die Berechnung der Toleranz im Vergleich zur ungestressten Probe (= 100 % KBE) des gleichen Stammes herangezogen.

### 2.18 Bezugsquellen

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die verwendeten Chemikalien von den Firmen Carl Roth & Co. (Karlsruhe), Merck KG Feinchemikalien und Laborbedarf Deutschland (Darmstadt), Serva Feinbiochemika & Co. (Heidelberg) und Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen) bezogen. Gase wurden von der Westfalen AG (Magdeburg) geliefert. Weitere Bezugsquellen sind in den Tabellen M8 und M9 aufgeführt.

**Tab. M8: Bezugsquellen Chemikalien**

Firma	Produkte
AppliChem (Darmstadt)	BCIP, NBT, Ribonuklease A, NADP, Gel-40-Lösung
Amersham (Freiburg)	LMW-gel filtration calibration kit
Biomers GmbH (Ulm)	Oligonukleotide
Difco Laboratories (Hamburg)	Trypton, Agar-Agar
Fermentas (St. Leon-Rot) (www.Fermentas.com)	Restriktionsenzyme und Puffer, Protein Molecular Weight Marker, Prestained Protein Molecular Weight Marker, T4-DNA-Ligase, T4-DNA-Ligase Puffer, Generuler 1kBp DNA Ladder, GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, dNTP's, SAP
IBA GmbH (Göttingen) (www.IBA-GO.com)	AHT, <i>Strep</i> -Tactin-Sepharose, Desthiobiotin, <i>Strep</i> -Tactin® AP-Konjugat
Invitrogen™ Life Technologies™ and ResGen™ (Karlsruhe)	APS, Hefeextrakt
Macherey-Nagel & Co. KG (Düren)	Nucleobond AX20-Kit
MERCK KgaA (Darmstadt)	Proteinase K, Chloramphenicol
Oxoid GmbH (Wesel)	Reinforced Clostridial Agar (RCA)
peqLab Biotechnologie (Erlangen)	<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase, PEQLAB-Gelextraction Kit
Promega Corporation (Madison, USA)	Anti-Rabbit-IgG-AP-Konjugat, Blot Qualified BSA
Qiagen (Hilden)	QIAquick Gel Extraction Kit, QIAfilter Plasmid Midi Kit
Roche (Mannheim)	DIG DNA Labeling Kit, Anti-Digoxigenin AP, Blocking Reagenz
Roth (Karlsruhe)	BSA (Albumin Fraktion V), Lysozym, Agarose, Ethidiumbromid, Brilliant Blue G-250, Brilliant Blue R-250, Phenol-Chloroform-IAA, TE-Puffer, Ammoniumacetat
Sigma-Aldrich Finechemicals (Taufkirchen) (www.sigma-aldrich.com)	TargeTron™ Gene-Knockout System, Ampicillin, Thiamphenicol, TritonX100, DTT, TEMED

**Tab. M9: Bezugsquellen Geräte**

<b>Firma</b>	<b>Produkte</b>
Analytik Jena (Jena)	Spekol 1100
Amersham Bioscience (Freiburg)	Ultrospec 3000
Biometra (Göttingen)	Power Pack P25, PCR-Cycler, Hybridisierungssofen, Cellulosenitratmembran, Mini-Gelkammern, Semi-Dry Fast-Blot Apparatur (Typ B31)
Bio-Rad-Laboratories GmbH (München)	Poly-Prep Chromatography Columns, Gene Pulser <sup>TM</sup> II
Chrompack (Frankfurt/Main)	Chrompack CP 9001 Gaschromatograph, Programm Maestro II
Eppendorf AG (Hamburg)	Thermomixer 5436, Spitzen, Pipetten, Reaktionsgefäße
Fisher Scientific (Schwerte)	Vortex Gene-2
Heraeus Instruments (Osterode)	Biofuge Fresco
MWG Biotech (Ebersberg)	Gelprint 2000
Medizin- und Labortechnik KG (Hamburg)	Ultraschall Desintegrator Sonopuls HD60
Müller&Krempel (Bülach)	Müller-Krempel-Flaschen
Kendro Laboratory Products GmbH (Langenselbold)	RC 5C Plus-Zentrifuge
Ochs (Bovenden)	Hybridisierungs-, Hungate-Röhrchen
Pharmacia Biotech (Wien)	Multiphor II-Anlage, MultiTempIII, Millipore
PreSens (Regensburg)	OxyView 3.51, Fibox 3 - Single Channel Fiber-optic Oxygen Meter
Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)	Spritzen, Kanülen
Sarstedt (Nümbrecht)	Petrischalen, 15-ml-Röhrchen, 50 ml-Röhrchen, 0,2 µm Sterilfilter, Einmalimpföse, Einmalspatel
Schleicher und Schuell Microscience GmbH (Dassel)	Sterilfilter Porengröße 0,2 µm, Whatman Papier, Nylonmembran
SIGMA Laborzentrifugen (Taufkirchen)	Celloshaker, Tischkühlzentrifuge 3K 30
Thermo-Dux (Wertheim)	Thermocycler Progene
WTW (Weilheim)	pH Meter pH526

### 3 Experimente und Ergebnisse

Zur Klärung der Funktion von reversen Rbrs und Dfx bei der oxidativen Stressabwehr von *Clostridium acetobutylicum* wurden zunächst Untersuchungen mit gereinigten Proteinen durchgeführt. Das Zusammenspiel verschiedener Proteinkomponenten sollte so unter Verwendung verschiedener optisch-enzymatischer Tests geklärt werden. Die dafür notwendigen Arbeiten sind im Folgenden erläutert.

#### 3.1 Klonierung von *rd*, *dfx*, *nrer*, *rubY* und *revrbr*

Um die Funktionalität eines ROS-Detoxifikationsweges in *C. acetobutylicum* in Anlehnung an einen von Weinberg *et al.* (2004) für *Pyrococcus furiosus* beschriebenen Reaktionsweg zu untersuchen, mussten zunächst die vermutlich beteiligten *C. acetobutylicum* Proteinkomponenten aufgereinigt werden. Die entsprechenden *C. acetobutylicum* Gene (Rubredoxin [*cac2778*, *rd*], Desulfoferrodoxin [*cac2450*, *dfx*], NADH:Rubredoxin Oxidoreduktase [*cac2448*, *nrer*], Rubrerythrin [*cac2575*, *rubY*; *cac3018*, *rbr2*] und reverses Rubrerythrin [*cac3597/98*, *revrbr3A/B*]) wurden hierzu heterolog in *E. coli* exprimiert. Dafür standen verschiedene Systeme zur Verfügung.

##### 3.1.1 Auswahl der Expressionssysteme

Bei der Darstellung verschiedener Proteine können Schwierigkeiten aufgrund unterschiedlicher Proteineigenschaften (z. B. Funktion des Proteins oder Neigung zur Bildung von Einschlusskörpern) häufig durch gezielte Auswahl unterschiedlicher Expressionssysteme umgangen werden. In dieser Arbeit wurden daher einerseits pASK-IBA-Derivate, andererseits pThyA-Derivate zum Klonieren der entsprechenden Gene verwendet.

Das IBA-System bietet verschiedene Vektoren mit unterschiedlicher zellulärer Lokalisation des resultierenden Fusionsproteins. Für alle pASK-IBA-Vektoren konnten die gleichen Restriktionsenzyme verwendet werden, sodass die Amplifikation der zu klonierenden Fragmente mittels eines einzigen Primerpaares möglich war. Hinzu kommt der Vorteil, dass die Produktion der Proteine bei einer bestimmten optischen Dichte induziert werden kann. IBA-Vektoren bieten somit eine gute Möglichkeit zur heterologen Expression von Proteinen in *E. coli*.

Der Vektor pThyA wurde ausgewählt, da dieses ursprünglich als Shuttlevektor konstruierte System die Möglichkeit bietet, die Proteine sowohl in Gram-positiven als auch in Gram-negativen Organismen herzustellen. Somit stand auch ein System zur Expression der Proteine direkt in *C. acetobutylicum* zur Verfügung.

### 3.1.1.1 IBA-Vektoren

Das *Strep*-Tag/*Strep*-Tactin-System ist eines der am weitesten verbreiteten Systeme zur affinitätschromatographischen Aufreinigung von Proteinen. Es bietet viele Vorteile gegenüber anderen Systemen, wie z. B. einen sehr kurzen Tag oder eine sehr schnelle Aufreinigung in einem Schritt unter physiologischen Bedingungen. Hinzu kommen in der Regel hohe Reinheit und Bioaktivität der gereinigten Proteine (Herstellerangaben; [www.iba-go.com](http://www.iba-go.com)). Die in die multiple Klonierstelle (multiple cloning site, MCS) der pASK-IBA-Vektoren klonierten Fragmente werden von einem durch Anhydrotetrazyklin (AHT) induzierbaren Promotor exprimiert. Dies ermöglicht eine gezielte Induktion der Proteinbildung bei Vorhandensein von genügend Zellmaterial. Der Promotor wird ohne Induktion durch den ebenfalls auf dem Plasmid kodierten *tet*-Repressor reprimiert. Zudem werden die klonierten Fragmente je nach gewähltem Vektor entweder am 3'- oder am 5'-Ende mit acht zusätzlichen Kodons fusioniert. Diese kodieren für die als *Strep*-TagII bezeichnete Aminosäuresequenz Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (Schmidt und Skerra, 2007) und ermöglichen die chromatographische Aufreinigung des Fusionsproteins über eine *Strep*-Tactin-Sepharose-Affinitätsmatrix (2.15.1). Der *Strep*-TagII hat laut Herstellerangaben aufgrund seiner geringen Größe keine Beeinträchtigung der biologischen Funktion des gereinigten Proteins zur Folge. Eine Selektion von plasmidtragenden Stämmen wird durch eine vom  $\beta$ -Lactamase-Gen (*bla*) vermittelte Ampicillinresistenz möglich.

In dieser Arbeit fand der Vektor pASK-IBA3 Verwendung. Er zeichnet sich durch einen C-terminalen *Strep*-TagII aus, wodurch bei der Aufreinigung nur vollständig translatierte Proteine an der Matrix haften bleiben. Die resultierenden Fusionsproteine sind cytoplasmatisch lokalisiert. Alle verwendeten und erzeugten Vektoren sind durch Karten im Anhang dargestellt (Abb. A1).

### 3.1.1.2 pT-Vektor

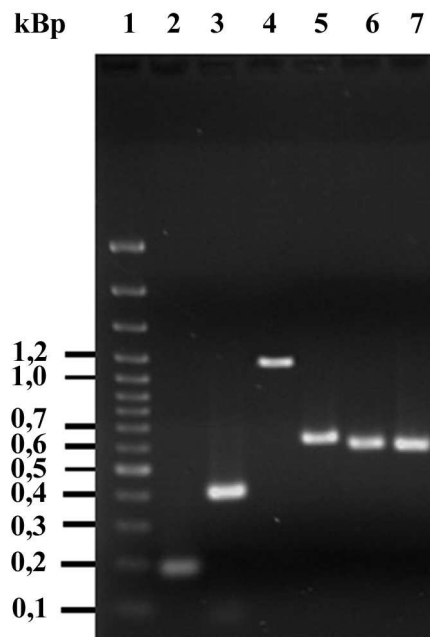
Dieser Vektor basiert auf einem *E. coli* - *C. acetobutylicum* Shuttlevektor für die Überexpression in *C. acetobutylicum* und der auch im IBA-System verwendeten Fusion des resultierenden Proteins mit einem *Strep*-TagII. Somit ermöglicht auch dieser Vektor eine schnelle und effiziente Proteinaufreinigung (Girbal *et al.*, 2005). Hier ist der *Strep*-TagII am C-Terminus des Fusionsproteins lokalisiert. Dieser Vektor beinhaltet davor allerdings keine multiple Klonierstelle wie die IBA-Vektoren, sondern das Gen *hydA* aus *C. acetobutylicum*. Dieses Gen konnte mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Xma*I herausgeschnitten (2.8.7.1) und durch ein entsprechend behandeltes anderes Gen ersetzt werden. Weiterhin zeichnet sich dieser Vektor durch das Vorhandensein eines Thiolase Promotors (*thl*-Promotor)

von *C. acetobutylicum* aus. Dieser Promotor zeigt seine stärkste Expression in der exponentiellen Phase (Tummala *et al.*, 1999), ist im Verhältnis zu anderen Promotoren jedoch relativ schwach exprimiert. So wird z. B. der *hydA*-Promotor 14 mal stärker exprimiert (Girbal *et al.*, 2003). Dies kann allerdings vorteilhaft sein, da die Proteinexpression so die Zelle nicht überlastet. Während dieser Arbeit stellte sich zudem heraus, dass dieser Promotor auch in *E. coli* aktiv ist. Es ist keine Induktion der Proteinexpression notwendig. Vermutlich durch eine erheblich höhere Kopienzahl des Plasmids in *E. coli* kommt es dort zu hohen Proteinausbeuten. Vektorkarten von pThydA und den erzeugten Plasmiden sind ebenfalls im Anhang ersichtlich (Abb. A2).

### 3.1.2 Amplifikation der Gene

Zunächst wurde aus *C. acetobutylicum* ATCC 824 chromosomale DNA mittels der von Bertram und Dürre (1989) beschriebenen Methode isoliert (2.8.6.1), welche anschließend als Matritze für die Polymerase-Kettenreaktion diente (2.8.8.). Die Konstruktion der Oligonukleotide erfolgte entsprechend den gängigen Vorschriften (Sequencing Brochure for LI-COR DNA-Sequencer 4000 and 4200 Series, MWG). Für die spätere Klonierung der Gene in die Expressionsvektoren wurde im *Forward*-Primer am 5'-Ende eine *Bam*HI-Schnittstelle direkt vor dem Startkodon des Gens eingefügt. Diese Oligonukleotide konnten meistens sowohl für Klonierungen in IBA-Vektoren, als auch in den pT-Vektor verwendet werden. Die *Reverse*-Primer wurden so gewählt, dass an deren 3'-Ende eine *Pst*I oder *Kpn*I (für IBA-Vektoren) bzw. eine *Xma*I-Restriktionsschnittstelle direkt über das geneigene Stoppkodon gelegt wurde. Nur so war eine Verschmelzung des resultierenden Proteins mit dem nachfolgenden *Strep*-TagII gewährleistet. Die verschiedenen Primerpaare sind im Anhang in Tab. A1 ersichtlich.

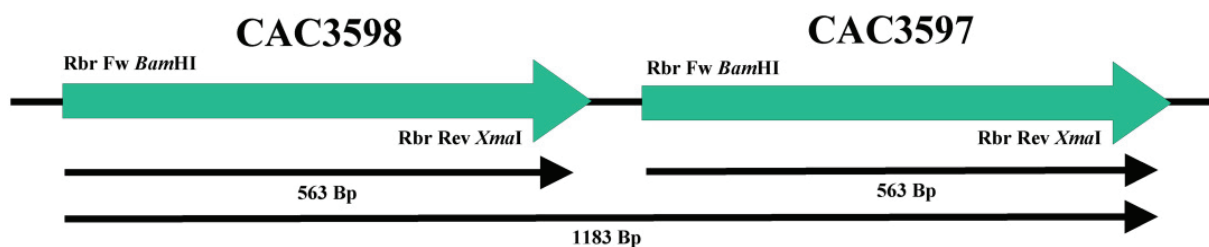
Um eine möglichst geringe Fehlerrate bei der Amplifikation zu erreichen, wurde eine Polymerase eingesetzt, die sich durch eine 3'-5'-Proofreading-Exonukleaseaktivität auszeichnet (Pwo-Polymerase, Peqlab). Die Amplifikation erfolgte nach dem unter 2.8.8.1. angegebenen Temperaturprofil. Die Reaktion erfolgte standardmäßig für 180 Sekunden je Zyklus, die Annealing-Temperatur betrug 45 °C. Die Amplifikation wurde mittels Agarosegelelektrophorese (2.8.1) überprüft, wie exemplarisch in Abbildung R1 dargestellt.



**Abb. R1: Amplifikation der Gene**

Dargestellt ist ein 1,0 %iges Agarosegel, aufgetragen wurden je 5 µl aus dem PCR-Ansatz.  
 1 GeneRuler™ 100 Bp Plus DNA Ladder; 2 *rd*; 3 *dfx*; 4 *nrer*; 5 *rubY*; 6 *rbr2*; 7 *revrbr*.

Da die Gene *cac3597* und *cac3598* nahezu identisch sind, zeigten die entsprechenden Oligonukleotide zu beiden Genen eine Affinität. Dadurch konnte es bei deren Amplifikation zur Entstehung unterschiedlich großer PCR-Fragmente kommen (s. Tab. A1). Es war möglich, dies durch Herabsetzung der Amplifikationszeit auf 30 Sekunden zu vermeiden. Eine Übersicht über die Fragmententstehung gibt Abb. R2.



**Abb. R2: Amplifikate der reversen Rbrs**

Graue Pfeile repräsentieren die Gene. Die Primer sind an den entsprechenden Bindestellen gekennzeichnet. Dabei entspricht der *Forward*-Primer (Fw-Primer) der Gensequenz, der *Reverse*-Primer (Rev-Primer) der Sequenz des Gegenstranges. Die unterschiedlichen Amplifikate sind mit Pfeilen unter den Genen dargestellt.

Es konnten für alle Gene spezifische PCR-Fragmente mit der erwarteten Größe (s. Tab. A1) nachgewiesen werden.

### 3.1.3 Restriktion der Amplifikate

Im Anschluss an die PCR erfolgte eine Ammoniumacetat-Ethanol-fällung (2.6.3.4). Das Pellet konnte in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gelöst und vollständig für die Restriktion eingesetzt werden (2.8.7.1). Die Fragmente wurden mit dem ersten Restriktionsenzym (*Pst*I, *Kpn*I, *Xma*I) ü. N. bei Raumtemperatur verdaut. Dabei fanden ausschließlich Enzyme des Herstellers Fermentas Verwendung, sodass es möglich war alle Restriktionen unter Zugabe des Puffers Y-Tango durchzuführen. Da das Enzym *Bam*HI einen 2x Y-Tango Puffer benötigt um unspezifische Restriktionen zu vermeiden, wurde nach 12ständiger Restriktion die Pufferkonzentration auf 2x erhöht und der Ansatz erneut für 3 h bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte eine Hitzeinaktivierung bei 85 °C für 30 min und eine Natriumacetat-Ethanol-fällung (2.6.3.3). Die so behandelten Fragmente wurden zur Ligation (2.8.7.3) in die entsprechend vorbereiteten Vektoren (2.8.7.1, 2.8.7.2) eingesetzt.

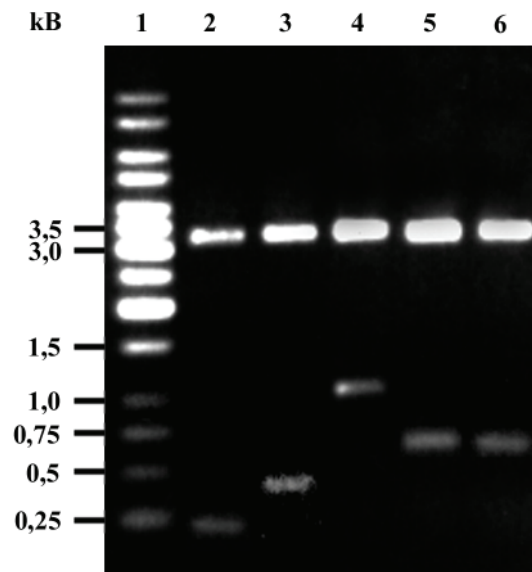
### 3.1.4 Ligation in verschiedene Vektorsysteme

Die zur Klonierung verwendeten Vektoren wurden zunächst aus *E. coli* DH5α isoliert (Plasmid-Mini-Präparation, 2.8.6.2) und ohne weitere Aufreinigung für die erforderlichen Restriktionen eingesetzt. Dazu wurde 1/5 des isolierten Plasmids 1:5 verdünnt. Die Vorgehensweise war analog zu der bei den PCR-Fragmenten. Nach erfolgter Restriktion (2.8.7.1) und Natriumacetat-Ethanol-fällung (2.6.3.3) wurden die Ansätze in 3 Fraktionen geteilt. Die erste Fraktion wurde unbehandelt für die Ligation genutzt. Die zweite Fraktion wurde zur Unterbindung möglicher Selbstligationen zusätzlich dephosphoryliert (2.8.7.2). Aus der dritten Fraktion wurde das zweifach restriktierte Plasmid mittels Gelelution (2.8.8.2) aufgereinigt. Die Ligation erfolgte wie in 2.8.7.3 beschrieben.

Für die Transformation in *E. coli* DH5α (2.9) fand der gesamte Ligationsansatz (20 µl) Verwendung. Rekombinante Klone wurden auf ihre plasmidvermittelte Ampicillinresistenz selektiert. Es stellte sich heraus, dass die Ligation in Vektoren der ersten Fraktion die besten Ergebnisse zeigte, wohingegen nach zusätzlicher Behandlung der Vektoren wie in Fraktion 2 und 3 im Anschluss keine oder nur sehr wenige Klone generiert wurden. Bei Verwendung von Fraktion 1 ergaben sich bei einem Verhältnis von Vektor zu Fragment von 3:7 etwa 50 % falsch-positive Klone (mit selbstligiertem Plasmid).

Zur Kontrolle der Ligation erfolgte eine Isolierung der Plasmide aus den Klonen mittels Plasmid-Mini-Präparation (2.8.6.2) und eine anschließende Doppelrestriktion (2.8.7.1) mit den entsprechenden Enzymen. Bei erfolgreicher Ligation des gewünschten Fragmentes konnte dieses herausgeschnitten und die Vektoren dadurch linearisiert werden. Abbildung R3 zeigt exemplarisch einen solchen Testverdau.





### Abb. R3: Überprüfung rekombinanter Klone

Dargestellt ist ein 0,8 %iges Agarosegel.

**1** Gene Ruler™ 1 kbp DNA Ladder; **1 - r:** Doppelrestriktionen von: **2** pI3rd; **3** pI3dfx; **4** pI3nrer; **5** pI3rubY; **6** pI3rbr2.

Abbildung R3 zeigt deutlich das Auftreten von je 2 Banden in Spuren, welche einen Doppelverdau enthielten. Bei der jeweils oberen Bande (bei ca. 3200 Bp) handelt es sich um den linearisierten Vektor (hier pASK-IBA3). Die zusätzlich auftretende zweite Bande entsprach der in Tab. R1 angegebenen erwarteten Größe der jeweiligen Inserts. Im Rahmen dieser Arbeit konnten *rd*, *dfx*, *nrer*, *rubY* und *rbr2* in den Vektor pASK-IBA3 kloniert werden. Die Klonierung von *revrbr* in IBA-Vektoren resultierte schon in einer vorangegangenen Arbeit (Riebe, 2005) nicht in zufriedenstellenden Aufreinigungsausbeuten und wurde deshalb hier nicht erneut durchgeführt. Alle oben genannten Fragmente, einschließlich *revrbr* (mit Ausnahme von *rbr2*), konnten ebenfalls erfolgreich in den pT-Vektor kloniert werden.

Zusammenfassend sind in Tab. R1 alle in dieser Arbeit erzeugten rekombinanten Plasmide aufgeführt. Wie angestrebt, ließen sich die PCR-Produkte parallel in die unterschiedlichen Vektoren klonieren.

**Tab. R1: Erzeugte rekombinante Überexpressionsplasmide**

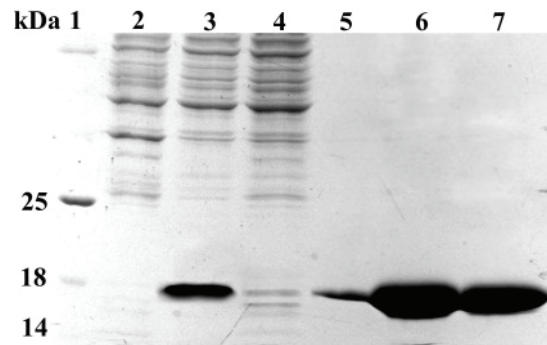
<b>Plasmid</b>	<b>relevante Merkmale (Vektor, endständige Schnittstellen der Insertion, Gene)</b>	<b>Insert [Bp]</b>
<b>pI3rd</b>	pASK-IBA3, <i>Bam</i> HI, <i>Pst</i> I, <i>rd</i>	172
<b>pI3dfx</b>	pASK-IBA3, <i>Kpn</i> I, <i>Bam</i> HI, <i>dfx</i>	385
<b>pI3nrer</b>	pASK-IBA3, <i>Kpn</i> I, <i>Bam</i> HI, <i>nrer</i>	1147
<b>pI3rubY</b>	pASK-IBA3, <i>Bam</i> HI, <i>Pst</i> I, <i>rubY</i>	595
<b>pI3rbr2</b>	pASK-IBA3, <i>Bam</i> HI, <i>Pst</i> I, <i>rbr2</i>	562
<b>pTrd</b>	pT, <i>Bam</i> HI, <i>Xma</i> I, <i>rd</i>	172
<b>pTdfx</b>	pT, <i>Bam</i> HI, <i>Xma</i> I, <i>dfx</i>	385
<b>pTnrer</b>	pT, <i>Bam</i> HI, <i>Xma</i> I, <i>nrer</i>	1147
<b>pTrubY</b>	pT, <i>Bam</i> HI, <i>Xma</i> I, <i>rubY</i>	595
<b>pTrevrbr3B</b>	pT, <i>Bam</i> HI, <i>Xma</i> I, <i>revrbr3B</i>	553

## 3.2 Heterologe Expression

Die so erzeugten plasmidtragenden *E. coli* DH5 $\alpha$ -Stämme konnten direkt zur Produktion der entsprechenden Proteine verwendet werden.

### 3.2.1 Heterologe Expression mittels pI-Vektoren

Die Proteinbildung in *E. coli* Stämmen mit pI-Derivaten musste bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 durch Zugabe von AHT induziert werden (2.3, 3.1.1.1). Es zeigte sich, dass nur bei den Stämmen *E. coli* pI3rd, pI3rubY und pI3dfx eine deutliche zusätzliche Bande nach Induktion der Genexpression im Proteingel auftrat (SDS-PAGE, 2.11.1). Bei den anderen Stämmen (*E. coli* pI3rbr2 und pI3nrer) war dies nicht der Fall. Trotzdem wurden alle Stämme auf die Möglichkeit der Proteinaufreinigung hin untersucht. Dabei konnten nur die Proteine Rd (ca. 1 mg aus 500 ml Kultur) und Dfx (ca. 3 mg aus 500 ml Kultur) mit hohen Ausbeuten aufgereinigt werden (2.15.1). Abb. R4 zeigt dies für Dfx. Trotz deutlich sichtbarer zusätzlicher Bande bei Expression des RubY konnte auch durch Variation der Expressionsbedingungen (12 h Inkubation bei 30 °C bzw. 20 °C) keine zufriedenstellende Aufreinigung dieses Proteins mit dem IBA-System erreicht werden. Bei NROR und Rbr2 zeigte sich weder eine Induktion im Gel, noch war eine Aufreinigung mit dem IBA-System möglich.



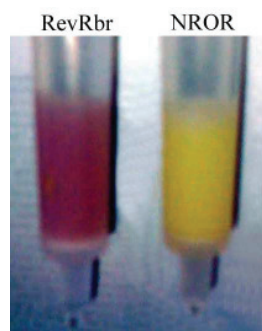
**Abb. R4:      Aufreinigung von Dfx**

Dargestellt ist eine 12,5 %ige SDS-PAGE. Coomassie gefärbtes Gel.

**1** Protein MW-Marker; **2** *E. coli* pI3dfx Gesamtzellaufschluss; **3** *E. coli* pI3dfx Gesamtzellaufschluss induziert; **4** Waschfraktion; **5 - 7** Elutionsfraktionen 2 – 4.

### 3.2.2      Heterologe Expression mittels pT-Vektor

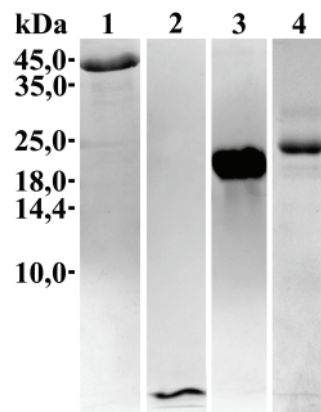
Da der pT-Vektor den konstitutiv exprimierten *thl*-Promotor beinhaltet, war hier keine Induktion notwendig. Dieser Promotor stammt ursprünglich aus *C. acetobutylicum*, stellte sich während der Arbeiten aber auch in *E. coli* als funktionell heraus. Auf 1D-Gelen (2.11.1) trat nur bei *E. coli* pTrevrbr3B eine eindeutige zusätzliche Bande der zu erwarteten Größe auf. Bei den anderen erzeugten *E. coli* Überexpressionsstämmen (pTrd, pTdfx, pTnror, pTrubY) waren die zusätzlichen Banden nur sehr schwach ausgeprägt. Es konnten jedoch aus allen Kulturen die jeweiligen Proteine gereinigt werden (2.15.1). Schon nach dem ersten Waschen der Säule zeigte sich die für Rd und revRbr charakteristische rote, bzw. für NROR charakteristische gelbe Farbe der Säule (Abb. R5). Im Falle von RubY zeigte sich nur eine schwache Rotfärbung, bei Dfx hingegen blieb die Säule vollständig farblos.



**Abb. R5:      Strep-Tactin-Säulen mit gebundenem Protein**

**l:** revRbr aus *E. coli* pTrevrbr3B; **r:** NROR aus *E. coli* pTnror.

Es konnten aus einer *E. coli* Kultur (500 ml) nach Expression der Proteine bei 30 °C ü. N. 5 mg revRbr, 3,5 mg Rd, 2,0 mg Dfx, 1,5 mg NROR und 0,4 mg RubY gewonnen werden. Abbildung R6 zeigt die Reinigungsfraction 3 der jeweiligen Proteine.



**Abb. R6:** **Gereinigte Proteine nach *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie**

Dargestellt ist eine 12,5 %ige SDS-PAGE. Coomassie gefärbtes Gel.

1 NROR; 2 Rd; 3 revRbr; 4 RubY.

### 3.2.3 Größenbestimmung von Proteinkomplexen mittels FPLC

Zum besseren Verständnis von Wechselwirkungen zwischen Proteinuntereinheiten wurden zusätzlich die nativen Größen der Proteine mittels FPLC bestimmt (2.15.4). Dies konnte Aufschluss über die Bildung von Homo- bzw. Heteromultimeren geben. Die native Größenbestimmung der gereinigten Proteine zeigte ein ausschließliches Vorkommen von NROR als Monomer (Tab. R2, Abb. R7). RubY trat als Dimer und als Tetramer auf, wobei die dimere Form erheblich bevorzugt zu sein schien. Dies stimmt auch mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen zu normalen Rbrs überein (LeGall *et al.*, 1988).

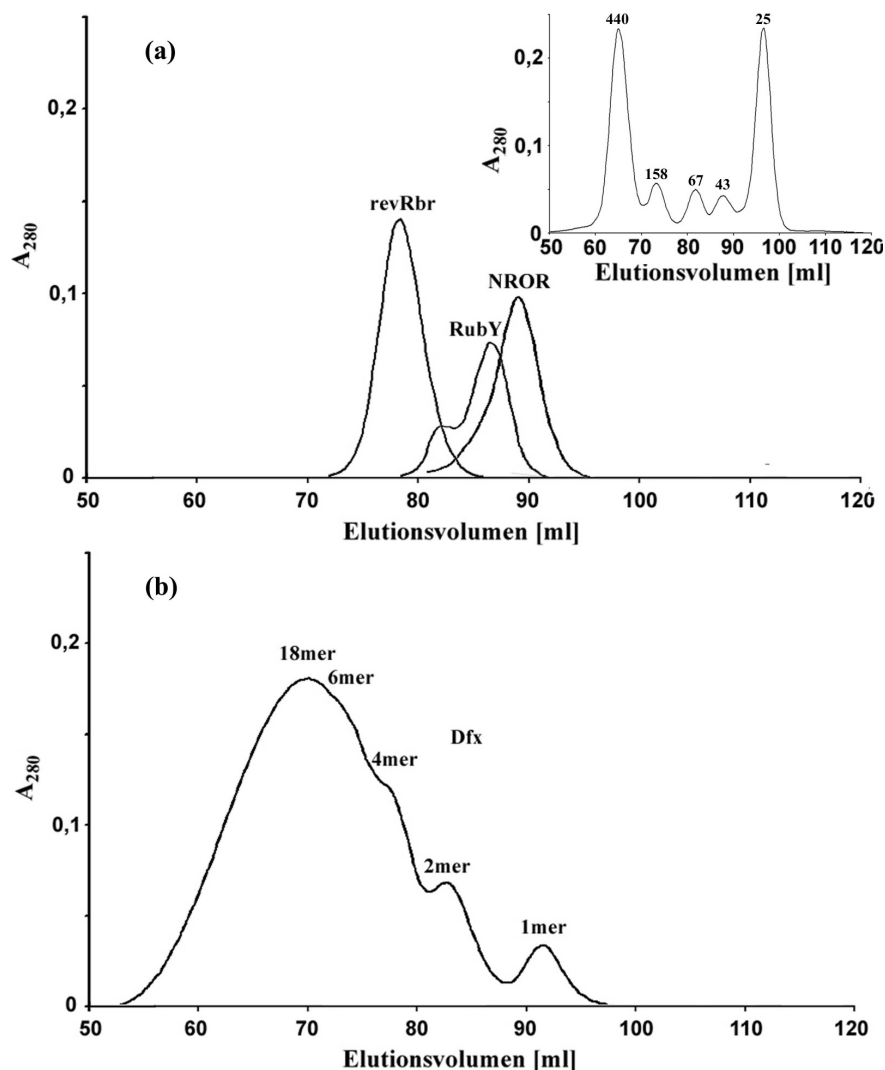
**Tab. R2:** **Größen exprimierter Proteine**

Protein	theoretisches MW [kDa] <sup>1</sup>	MW im 1D-Gel [kDa] <sup>1</sup>	MW in FPLC [kDa] <sup>1</sup>	vermutliche Untereinheiten nach FPLC [Mer]
<b>Rd</b>	6,819	nicht bestimmt (< 10 kDa)	nicht bestimmt (< 10 kDa)	nicht bestimmt
<b>Dfx</b>	14,566	15,0 – 16,5	8,0 – 9,0	1
			37,0	2
			74,0 – 79,0	4
			112,5 – 127,5	6
			195,0 – 236,0	18
<b>NROR</b>	42,175	42,0 – 44,0	44,5 – 45,4	1
<b>RubY</b>	23,047	22,5 – 24,0	18,5 – 20,0	1
			53,5 – 56,0	2 - (3)
			76,0 – 82,5	4
<b>revRbr</b>	20,996	20,0 – 23,0	112,0 – 127,0	4 – (6)

<sup>1</sup> Molekulargewicht nach Proteindatenbank Swissprot ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) plus Aminosäuren des *Strep*-TagII (889 Da unter der Annahme, dass 333 Aminosäuren =  $3,7 \times 10^4$  Da [Fermentas Katalog, Appendix]).

Überraschenderweise zeigte sich jedoch bei revRbr das alleinige Vorhandensein einer tetrameren Form. Dieses Ergebnis konnte auch in der Arbeitsgruppe von Donald Kurtz (Universität San Antonio, Texas, USA) bestätigt werden.

Ein ganz anderes Bild ergab sich für Dfx. Dieses Protein neigte dazu höherzahlige Multimere zu bilden, wobei die kleinerzahligen Multimere trotzdem noch nachweisbar waren. Hierbei neigten die Monomere dazu zu dimerisieren (1-mer, 2-mer, 4-mer), wohingegen Multimere anscheinend bevorzugt trimerisierten (6-mer, 18-mer). Die Größenbestimmung war im höhermolekularen Bereich (ab ca. 120 kDa) zunehmend ungenau. Multimere aller Proteine zeigten zudem höhere Molekulargewichte als theoretisch berechnet, vermutlich begründet durch die Bildung von Ringstrukturen.

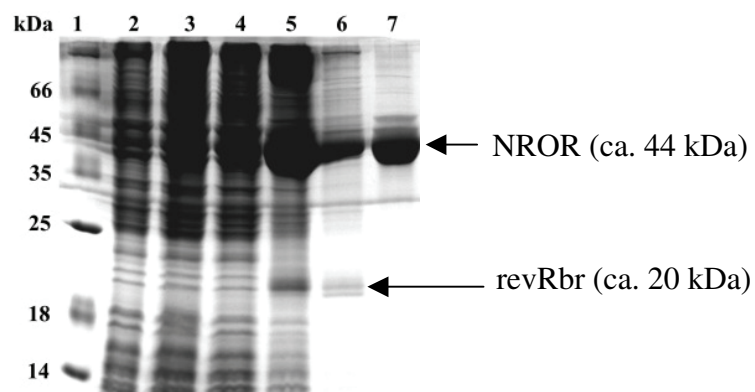


**Abb. R7: Bestimmung von Molekulargewichten nativer Proteine.**

Proteinfraktionen wurden mittels FPLC-Gelfiltration analysiert und bei 280 nm detektiert. (a) gereinigtes revRbr, RubY und NROR; (b) gereinigtes Dfx. **Einsatz:** Proteine mit bekannten MW (Ferritin, 440 kDa; Aldolase, 158 kDa; Albumin, 67 kDa; Ovalbumin, 43 kDa; Chymotrypsinogen, 25 kDa).

### 3.2.4 Interaktionsstudien

Neben der reinen Größenbestimmung der gereinigten Proteine durch FPLC (3.2.3) und dem damit verbundenen Nachweis der Bildung von Homomultimeren von RubY, revRbr und Dfx erfolgten auch FPLC-Analysen von Proteingemischen mit unterschiedlichen Kombinationen der gereinigten Proteine. Dabei waren die Proteinmengen auf ein molekulares Verhältnis von 1:1 eingestellt (2.15.2). Vor einer Applikation des Proteingemisches auf die FPLC-Säule wurde die Probe für 1 h bei 37 °C unter aeroben Bedingungen inkubiert. Die Kombinationen NROR/revRbr, Rd/NROR/revRbr, Rd/NROR, Rd/NROR/Dfx zeigten Elutionspeaks, die denen der einzelnen Proteine bei alleinigem Auftrag entsprachen (Daten nicht gezeigt). Es konnte somit auf diesem Wege keine Bildung von Heteromultimeren nachgewiesen werden. Allerdings ergab sich in einem weiteren Experiment ein anderes Ergebnis. Da NROR bei allen untersuchten Teilreaktionen der initiale Elektronenüberträger zu sein scheint, wurde dieses Protein zunächst nach Überexpression in *E. coli* pTnror an eine *Strep*-Tactin-Säule gebunden (vgl. Proteinaufreinigung, 2.15.1). Anschließend erfolgte ein Waschschriff mit 2 ml Puffer W<sub>OE</sub>, wodurch die nicht gebundenen *E. coli* Proteine von der Säule gewaschen wurden. Im Anschluss daran wurde Gesamtprotein des *C. acetobutylicum* Wildtyps aufgetragen (Überstand eines Zellaufschlusses einer 250-ml-ü. N.-CGM-Kultur) (2.14.2). Nach Durchfluss des Proteingemisches erfolgte kein Waschschriff, um die im Vergleich zur NROR nur locker gebundenen Proteine nicht abzuwaschen. Die Elutionsfraktionen (Abb. R8, Spuren 4 – 6) zeigten eindeutig die Anreicherung einer Proteinbande im Bereich von 20 kDa.



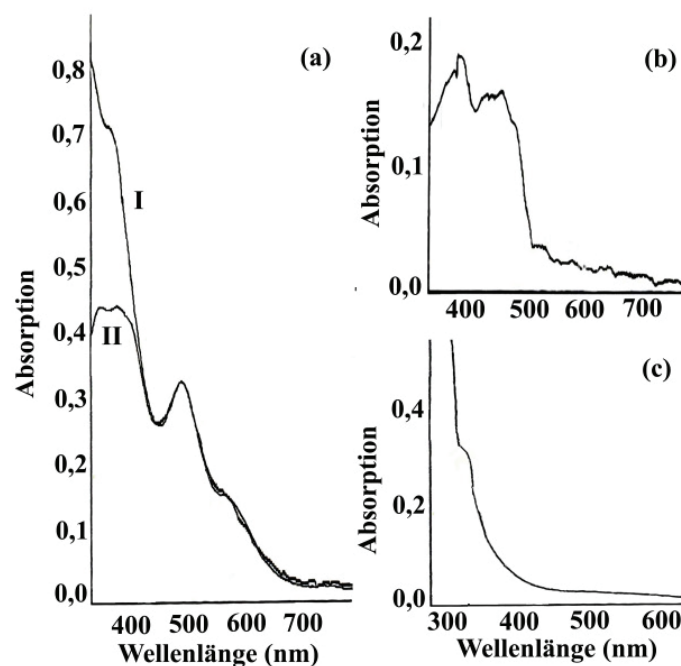
**Abb. R8: Interaktion von NROR mit anderen Proteinen an *Strep*-Tactin-Säulen**

Dargestellt ist eine 12 %ige SDS-PAGE, Coomassie gefärbt. Spuren 4 und 5 zeigen neben der Anreicherung der *Strep*-TagII fusionierten NROR bei ca. 44 kDa die Anreicherung eines weiteren Proteins bei 20 kDa (s. Pfeile). Die Proteinbanden wurden isoliert und massenspektrometrisch identifiziert. **1** 1 kD Protein MW Marker; **2** *C. acetobutylicum* Wt Überstand Zellaufschluss; **3** Säulendurchfluss *C. acetobutylicum* Wt Überstand Zellaufschluss; **4** Elutionsfraktion 2 (ohne Waschen); **5** Elutionsfraktion 3; **6** Elutionsfraktion 4; **7** gereinigte NROR aus *E. coli* pTnror.

Durch massenspektrometrische Untersuchungen (durchgeführt an der Universität Greifswald) konnte dieses Protein als revRbr identifiziert werden. Abb. R8 zeigt das zur Identifikation der wechselwirkenden Proteine verwendete SDS-Gel.

### 3.2.5 Spektren der verschiedenen Proteine und deren Beeinflussung durch Oxidation/Reduktion

Die gereinigten Proteine (2.15.1) wurden weiterhin auf ihre spektralen Eigenschaften hin untersucht (2.15.3). Die Spektren zwischen 330 und 700 nm sind in Abb. R9 ersichtlich. Die Spektren der oxidierten, frisch isolierten („as isolated“) Form von Rd und revRbr zeigten ähnliche Absorptionsspektren mit Maxima bei 350, 375, 492 und 565 nm (Abb. R9a). Der Peak bei 492 nm und die Schulter bei 565 nm sind charakteristisch für  $[\text{Fe}(\text{SCys})_4]$ -Zentren, wie sie auch in Rds und Rbrs anderer Organismen vorkommen (Gupta *et al.*, 1995; Jin *et al.*, 2004a und 2004b).



**Abb. R9: Absorptionsspektren**

Gezeigt sind die Absorptionsspektren der Elutionsfraktion 3 direkt nach der aeroben affinitätschromatographischen Aufreinigung („as isolated“) der Proteine an *Strep*-Tactin-Sepharose. Spektren von (a) reversem Rubrerythrin (revRbr) (I) und Rubredoxin (Rd) (II); (b) NADH:Rubredoxin Oxidoreduktase (NROR); (c) Desulfoferrodoxin (Dfx).

Die im Vergleich zu Rd höhere Absorption von revRbr im Bereich von 330 – 400 nm ist auf die zusätzliche Nicht-Schwefel-Eisen-Domäne, ähnlich der des Ferritins, im revRbr zurückzuführen (s. Abb. E4 und E5). Da diese Absorptionseigenschaften nur bei Vorhandensein von Eisen in den Zentren verursacht wird, konnte von einer korrekten

Besetzung der Zentren und damit deren Funktionalität ausgegangen werden. Beide Proteine (Rd und revRbr) waren durch Zugabe einer äquimolaren Menge an Na-Dithionit unter anaeroben Bedingungen vollständig reduzierbar.

Zelllysate von *E. coli* pI3rd, pTrd und pTrevrbr3B oder *C. acetobutylicum* pTrd und pTrevrbr3B, welche Rd oder revRbr überexprimierten, zeigten genau wie die gereinigten Proteine eine für oxidierte Eisenschwefelzentren charakteristische rote Färbung. Die Farbe nahm unter Sauerstoffexposition zu, verschwand allerdings in Zelllysaten binnen weniger Minuten, wenn keine Luft mehr zugeführt wurde. Die Fähigkeit zur Regeneration wurde nach mehrmaligem Wiederholen immer schwächer.

Gereinigte NROR wies eine gelbe Färbung (vgl. 3.2.2., Abb. R5) mit Absorptionsmaxima bei 380 und 450 nm und einer Schulter bei 490 nm auf (Abb. R9b). Dies ist charakteristisch für Proteine mit Flavinen als prosthetische Gruppe und stimmt mit früheren Erkenntnissen zur NROR überein (Guedon und Petitdemange, 2001).

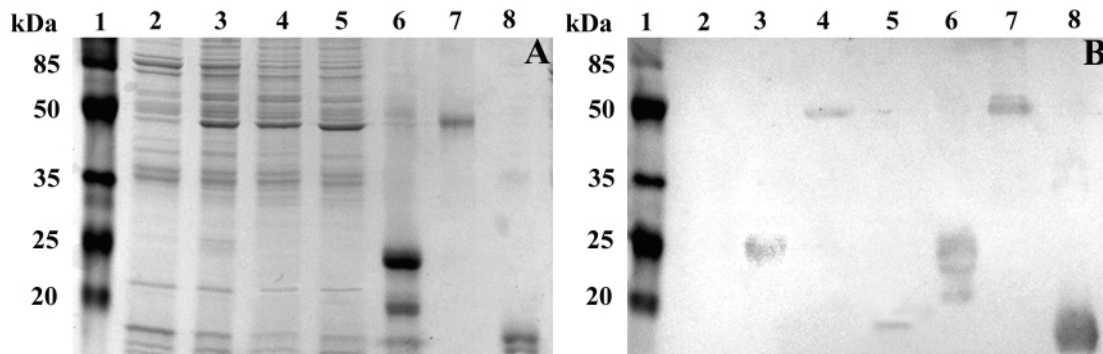
Das Spektrum von Dfx zeigte im Bereich zwischen 400 und 700 nm keine Auffälligkeiten (Abb. R9c). Eine Schulter bei 330 nm konnte, wie schon für andere SORs beschrieben, beobachtet werden (Emerson *et al.*, 2003). Eine fehlende Veränderung des Spektrums unter aeroben Bedingungen deutete auf hohe Sauerstoffstabilität des Enzyms hin.

### 3.2.6 Nachweis von Proteinen mittels Western-Blot

Überexpressionsplasmide des pT-Typs fanden auch bei der Überexpression der Proteine direkt in *C. acetobutylicum* Anwendung. Begründet durch die wesentlich kürzere Aufschlussprozedur und die vergleichsweise leichte Kultivierung von *E. coli* wurden *C. acetobutylicum* Kulturen in der Regel nicht zum Reinigen der Proteine verwendet. Überexpressionsstämme von *C. acetobutylicum* wurden wie unter 2.10 beschrieben hergestellt. Es konnten so die Stämme *C. acetobutylicum* pTdxf, pTrevrbr3B und pTnrör erzeugt werden, welche die Proteine Dfx, revRbr und NROR überexprimieren sollten. Das Vorhandensein dieser Proteine konnte zum einen durch das Auftreten einer zusätzlichen Bande in 1D-Gelen (besonders auffällig bei *C. acetobutylicum* pTrevrbr3B), zum anderen mit Hilfe eines immunologischen Nachweisverfahrens überprüft werden. Letzteres geschah für die in den „*in vivo*“ Experimenten verwendeten Überexpressionsstämme mittels Western-Blot (2.15.5). Verwendung fand dabei ein gegen den *Strep*-TagII gerichteter spezifischer Antikörper (2.15.6). Um sicherzustellen, dass unter den gegebenen Bedingungen der Stressexperimente (s. 3.6.4) die Proteine auch wirklich in den Zellen vorhanden waren, erfolgte die Probennahme für die Western-Blots bei der gleichen optischen Dichte. Die *C. acetobutylicum* Proben wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen (2.14.2) und die Proteine



in den Zellaufschlüssen mittels SDS-PAGE (2.11.1) separiert. Im Anschluss konnten die Proteine aus dem Gel auf eine Nylonmembran wie unter 2.15.5 beschrieben geblottet und visualisiert werden (2.15.6). Ein solcher Western-Blot ist in Abb. R10 gezeigt.



**Abb. R10: Nachweis rekombinanter *Strep*-TagII Proteine**

Dargestellt ist eine 12,5 %ige SDS-PAGE. **A** Coomassie gefärbtes Gel und **B** der resultierende Western-Blot nach der Detektion. Rekombinante *Strep*-TagII-Proteine wurden mittels *Strep*-Tag-Antikörper detektiert und durch NBT/BCIP-Färbung visualisiert. Auf beide Gele wurden gleiche Mengen an Protein aufgetragen. **1** Prestained Protein MW-Marker; **2** Gesamtprotein *C. acetobutylicum* Wt; **3** Gesamtprotein *C. acetobutylicum* pTrevrbr3B; **4** Gesamtprotein *C. acetobutylicum* pTnror; **5** Gesamtprotein *C. acetobutylicum* pTdfox; **6** gereinigtes revRbr; **7** gereinigte NROR; **8** gereinigtes Dfx.

Die Überexpression der Proteine Dfx, NROR und revRbr konnte in den erzeugten *C. acetobutylicum* Stämmen bei einer OD<sub>600</sub> von 1,0 durch diese Methode bestätigt werden. Aufgrund längerer Lagerungszeiten der gereinigten Proteine im Vorfeld des gezeigten Experiments kam es bereits zu sichtbarem Proteinabbau (besonders in Spur 6 für revRbr sichtbar). Die Banden der gereinigten Proteine waren im Blot auf der gleichen Höhe lokalisiert wie die Signale in Spuren, welche das Proteom der entsprechenden Überexpressionsstämmen enthielten. In den *C. acetobutylicum* Stämmen waren zudem potenziell ebenfalls alle anderen an dem zu untersuchenden Entgiftungsweg beteiligten Proteine – wenn auch nicht in quantifizierten Mengen – vorhanden. Eine Quantifizierung über diese Methode war nicht möglich, da diese nativen Zellproteine nicht mit einem *Strep*-TagII fusioniert waren. Folglich konnte davon ausgegangen werden, dass auch der notwendige Elektronentransport für die Regeneration der überexprimierten Proteine nach erfolgter Entgiftungsreaktion stattfinden konnte. Somit war es nun möglich den Einfluss der exprimierten Proteine *in vivo* zu untersuchen.

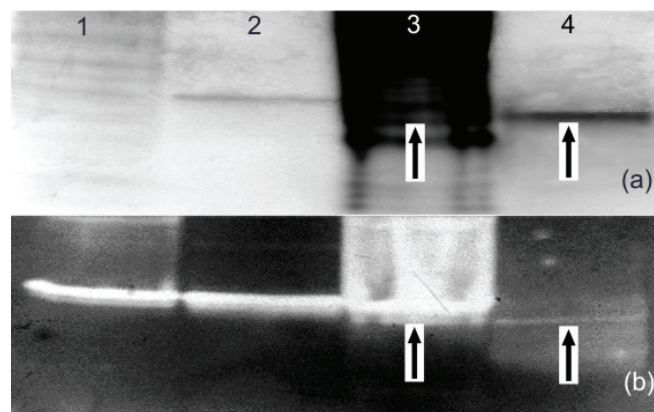
### 3.3 Untersuchung der Enzymaktivität von Desulfoferrodoxin

In *P. furiosus* wird Superoxid ( $O_2^-$ ) durch eine Superoxid-Reduktase (SOR) zu Wasserstoffperoxid umgewandelt. Die dazu notwendigen Elektronen stammen von NAD(P)H und werden mit Hilfe einer kleinen Elektronentransportkette, bestehend aus den Proteinen Rd und NROR, übertragen (Weinberg *et al.*, 2004).

In Clostridien wurden SORs und im speziellen Desulfoferrodoxine bisher nicht analysiert. Im Folgenden wird die Charakterisierung dieses Proteins aus *C. acetobutylicum* mittels verschiedener *in vitro* Testsysteme dargestellt.

#### 3.3.1 Superoxid-Dismutase Aktivität von *C. acetobutylicum* Dfx

Für *P. furiosus* SOR wurde eine geringe SOD-Aktivität von 200 U/mg beschrieben (Jenney *et al.*, 1999). Diese ist verglichen mit anderen Proteinen, die als SOD charakterisiert wurden (1800 U/mg bei der SOD vom Rind), zwar gering, scheint aber eine Nebenaktivität von SORs darzustellen. Zum Nachweis einer SOD-Aktivität erfolgte eine gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen in einer nativen PAGE (2.11.2), wobei diese Gele anstatt APS Riboflavin enthielten. Dieses Vitamin B2 verursachte eine Produktion von Superoxid, auf deren Vorhandensein das Gel wie unter 2.17.1 beschrieben überprüft werden konnte. Bei Abwesenheit von Superoxid infolge von SOD-Aktivität ergab sich an der entsprechenden Stelle im Gel folglich keine Färbung. Eine SOD-Aktivität des Dfx aus *C. acetobutylicum* konnte in einem solchen Zymogramm nachgewiesen werden (Abb. R11).



**Abb. R11: SOD-Aktivität von *C. acetobutylicum* Dfx**

Die SOD-Färbung der Gele wurde wie in 2.11.2 und 2.17.1 beschrieben durchgeführt (Beauchamp und Fridovich, 1971). (a) 12,5 %ige native PAGE, Coomassie gefärbt. 1 10 µg Protein *E. coli* DH5α-Zelllysate; 2 2,5 µg Fe-SOD *E. coli*; 3 40 µg *E. coli* pI3dfx induziert; 4 10 µg gereinigtes *C. acetobutylicum* Dfx; (b) 12,5 %ige native PAGE, auf SOD-Aktivität hin gefärbt. Spurenbelegung wie in (a).

10 µg gereinigtes Dfx riefen eine deutliche, klare Bande in dem Test hervor (Pfeil Spur 4). Eine entsprechende Bande der gleichen Größe war auch in der Spur sichtbar, die ein Zelllysats des Dfx überexprimierenden *E. coli* Stammes pI3dfx enthielt (Spur 3). Im Vergleich zu 2,5 µg der *E. coli* Fe-SOD (Spur 2) war die Bande und somit auch die Aktivität in Spur 4 auch bei Einsatz von 10 µg Dfx wesentlich schwächer.

### 3.3.2 Superoxid-Reduktase Aktivität von *C. acetobutylicum* Dfx

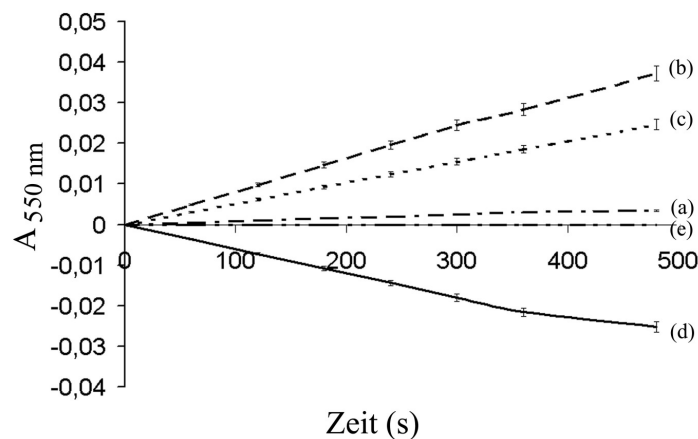
Dfx sollte, in Übereinstimmung mit der vermuteten Funktion als SOR in dem Entgiftungsweg für ROS bei *C. acetobutylicum*, dazu befähigt sein als endständige Komponente Elektronen auf Superoxid zu übertragen. Die hierzu erfolgten Tests sind im Folgenden beschrieben.

#### 3.3.2.1 Cytochrom C-abhängige SOR-Aktivität von Dfx

Zur Untersuchung einer möglichen SOR-Aktivität von Dfx fand zunächst der unter 2.17.2.2 beschriebene CytC-abhängige Test Verwendung. Es liegt folgende Reaktion zugrunde:



Ursprünglich wurde dieses Verfahren zum Nachweis von SOD-Aktivität entwickelt, konnte aber an die Detektion von SOR-Aktivität angepasst werden (Jenney *et al.*, 1999). Dieser Test bot den Vorteil, dass die Aktivität unabhängig von NAD(P)H als Elektronendonator und den anderen Proteinkomponenten bestimmt werden konnte. Aufgrund seines Reduktionspotenzials wurde CytC in aeroben Lösungen reduziert, was eine steigende Absorption bei 550 nm verursachte (Abb. R12, a). Diese Reduktion wurde bei Anwesenheit von Superoxid (produziert durch die Xanthin/Xanthin Oxidase Reaktion [ $\text{Xanthin} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Harnsäure} + \text{O}_2^- + 2 \text{H}^+$ ]) erheblich beschleunigt (b). Sowohl SOD als auch SOR konnten diese Reduktion konzentrationsabhängig inhibieren. Eine Unterscheidung zwischen SOD- und SOR-Aktivität war dadurch möglich, dass SOD die Reaktion auch bei Einsatz hoher Enzymkonzentrationen nur vollständig inhibieren konnte (e). SOR-Aktivität hingegen würde CytC sogar oxidieren, resultierend in einer sinkenden Absorption bei 550 nm. Letzteres konnte eindeutig für Dfx von *C. acetobutylicum* gezeigt werden (c und d). 0,2 µM Dfx inhibierten die Reduktion von CytC um 50 % (c). Bei Einsatz von hohen Enzymmengen (10 µM) zeigte sich die maximale Oxidation von CytC (d). Fe-SOD von *E. coli* hingegen konnte die Reduktion von CytC nur bis auf den Level der Blindreaktion inhibieren. Dies konnte auch bei Zugabe von 0,875 µM Dfx erreicht werden (e).

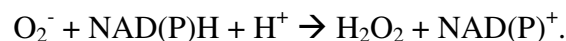


**Abb. R12: Effekt von Dfx auf die Reduktion/Oxidation von CytC**

Die Reaktion wurde unter aeroben Bedingungen bei RT in einem Puffer aus 100 mM Tris-HCl und 150 mM NaCl bei pH 8,0 durchgeführt. (a) Autoreduktion von CytC (20 µM) in aerober Lösung; (b) Verstärkte Reaktion in Anwesenheit von Superoxid im Ansatz (produziert durch Xanthin/Xanthin Oxidase Reaktion); (c) Dfx (0,2 µM) inhibiert die  $O_2^-$ -abhängige Reduktion von CytC; (d) Hohe Dfx-Konzentrationen (10 µM) können CytC oxidieren; (e) Hohe Konzentrationen SOD (40 U) verursachen keine Oxidation von CytC. Bei Verwendung von 0,875 µM Dfx fand weder Oxidation, noch Reduktion von CytC statt.

### 3.3.2.2 Rd/NROR-abhängige SOR-Aktivität von *C. acetobutylicum* Dfx

Nach erfolgreichem Nachweis einer SOR-Aktivität des Dfx im CytC-Test konnte in einer Rekonstruktion des vermuteten Entgiftungsweges nun auch die Interaktion mit den anderen Proteinkomponenten sowie den notwendigen Substraten und die Bestimmung des Reaktionsproduktes erfolgen. Diesen Experimenten liegt folgende Reaktion zugrunde:



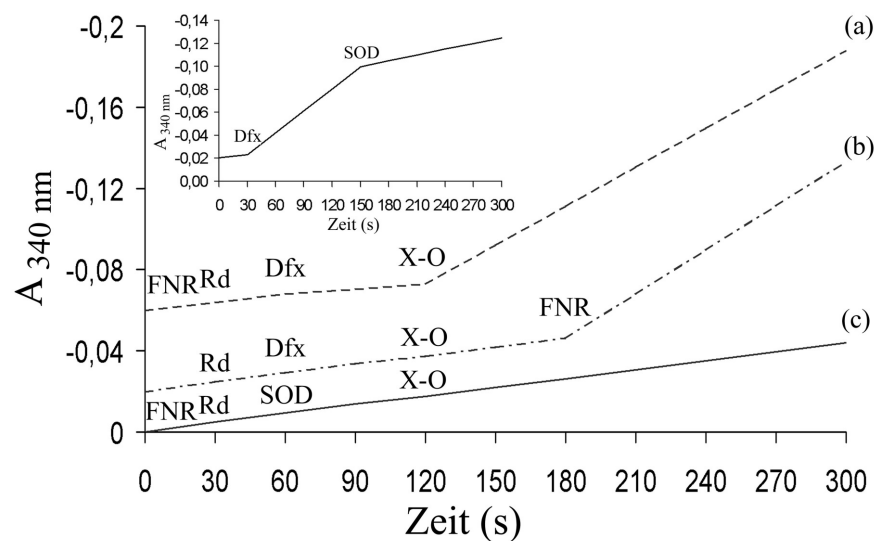
Die Beteiligung der Proteine NROR bzw. FNR und Rd bei der Elektronenübertragung hin zum Dfx während dieser Reaktion sollte zudem aufgeklärt werden.

#### 3.3.2.2.1 NROR/Rd/Dfx-abhängiger NAD(P)H-Verbrauch

Dfx wurde in dem unter 2.17.2.3 beschriebenen *in vitro* Test als SOR eingesetzt, wobei reduziertes Rd als Elektronendonator fungierte. Letzteres konnte durch Zugabe von NROR bei Vorhandensein von NADH regeneriert werden und so immer wieder von neuem Elektronen auf Dfx übertragen.

Da in bereits untersuchten Systemen anderer Organismen aufgrund erfolgloser Aufreinigungen (vermutlich verursacht durch toxische Nebeneffekte der jeweiligen NRORs in *E. coli* [Grunden *et al.*, 2005]), das Enzym FNR aus Spinat als NROR-Ersatz verwendet wurde, fanden auch Experimente mit diesem Enzym als initialen Elektronenüberträger statt. In diesem Fall waren die Reaktionen NADPH-abhängig.

Abbildung R13 macht den Verlauf der Reaktion und den Einfluss der verschiedenen Komponenten für diesen FNR-abhängigen Test deutlich.



**Abb. R13: SOR-Aktivität von *C. acetobutylicum* Dfx**

Der NAD(P)H-Verbrauch wurde bei 340 nm in 400- $\mu$ l-Reaktionsansätzen verfolgt. Alle Proteine und Reagenzien wurden aus aeroben Stammlösungen zu den eingezeichneten Zeitpunkten zugegeben. (a) Start der Produktion von Superoxid durch X-O; (b) Zugabe von FNR/NROR zu dem ansonsten vollständigen Reaktionsansatz; (c) SOD von *E. coli* verursachte keinen NAD(P)H-Verbrauch. **Einsatz:** Effekt von 40 U SOD in einem Aktivitätstest von Dfx (vgl. [a] und [b]) auf den NAD(P)H-Verbrauch. Rd, Rubredoxin; Dfx, Desulfoferrodoxin; FNR, Ferredoxin:NADP<sup>+</sup> Reduktase; NROR, NADH:Rubredoxin Oxidoreduktase; X-O, Xanthin Oxidase; SOD, Superoxid-Dismutase von *E. coli*.

Eine Abnahme der Extinktion bei 340 nm infolge von NAD(P)H-Verbrauch zeigte sich erst nach Zugabe von Xanthin Oxidase und der damit verbundenen Produktion von Superoxid im Ansatz. Dies war nur der Fall, wenn FNR (bzw. NROR), Rd und Dfx ebenfalls in dem Reaktionsansatz enthalten waren (a). Es fand kein NAD(P)H-Verbrauch statt, wenn eine der Proteinkomponenten nicht im Ansatz vorhanden war. Die Zugabe der fehlenden Komponente resultierte in SOR-Aktivität (b). Um sicherzustellen, dass es sich tatsächlich um eine SOR-Aktivität handelt, wurde eine Fe-SOD von *E. coli* eingesetzt. Bei Verwendung dieses Enzyms anstelle von Dfx erfolgte kein NAD(P)H-Konsum. Dies verdeutlicht, dass im Gegensatz zu einer SOR die SOD nicht in der Lage ist Elektronen von einer der Komponenten im Reaktionsansatz zu verwenden (c). Bei Zugabe von SOD zu einem kompletten Reaktionsansatz der auch Dfx beinhaltete, schwächte sich der Verbrauch von NAD(P)H ab

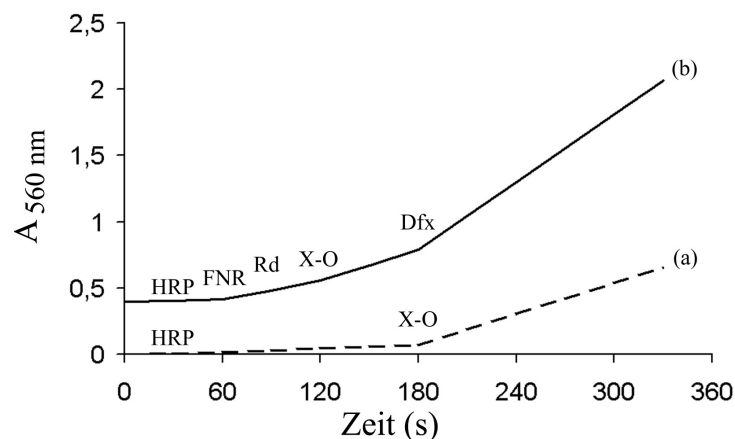
(Abb. R13, Einsatz). Dies deutet darauf hin, dass SOD und Dfx um das Substrat  $O_2^-$  konkurrieren und somit auch der NAD(P)H-Verbrauch durch Dfx sinkt.

Die Verwendung verschiedener Enzymkonzentrationen der verschiedenen Komponenten resultierte zudem in veränderten Aktivitäten des Dfx. Standardmäßig wurden deshalb, wie auch in Tests anderer Arbeitsgruppen beschrieben, alle Proteine in einer Konzentration von 1  $\mu$ M eingesetzt (Coulter und Kurtz, 2001; Emerson *et al.*, 2003).

Durch Variation der Rd- bzw. der Dfx-Konzentrationen wurden folgende Umsatzraten ermittelt: 5,75  $\mu$ M NAD(P)H pro  $\mu$ mol Rd pro min bei Überschuss von Dfx und 4,65  $\mu$ M NAD(P)H pro  $\mu$ mol Dfx pro min bei Überschuss von Rd. Damit liegen die Bestimmten Umsatzraten etwas niedriger als bei Dfx von *D. vulgaris* (12,5  $\mu$ M NAD(P)H pro  $\mu$ mol Rd bei Überschuss von Dfx [Emerson *et al.*, 2003]).

### 3.3.2.2.2 NROR/Rd/Dfx-abhängige $H_2O_2$ -Bildung

Wasserstoffperoxid, das vermutliche Produkt der SOR-Reaktion, wurde durch einen indirekten Test bestimmt (2.17.2.4). Das Substrat Amplex Red wird bei Anwesenheit von  $H_2O_2$  durch eine Peroxidase (HRP) zu Resorufin umgewandelt (Seaver und Imlay, 2001). Diese Umwandlung wurde photometrisch bei 560 nm verfolgt (Abb. R14).



**Abb. R14: Entstehung von  $H_2O_2$  während der SOR-Reaktion**

Die Entstehung von  $H_2O_2$  als Produkt der SOR-Reaktion wurde bei 560 nm photometrisch verfolgt. Bei Anwesenheit von  $H_2O_2$  entsteht durch eine Amplex Red/HRP-Reaktion Resorufin. (a)  $H_2O_2$ -Produktion durch Xanthin Oxidase (Blindreaktion); (b)  $H_2O_2$ -Produktion durch Xanthin Oxidase und Dfx. Rd, Rubredoxin; Dfx, Desulfoferrodoxin; FNR, Ferredoxin:NADP<sup>+</sup> Reduktase; X-O, Xanthin Oxidase; HRP, Peroxidase aus Meerrettich.

Die Xanthin/Xanthin Oxidase Reaktion, welche für die Produktion von Superoxid im Reaktionsansatz verwendet wurde, verursachte neben Superoxid auch die Entstehung einer geringen Menge an  $H_2O_2$  (a). Die Zugabe von Dfx zu einem Reaktionsansatz, der alle anderen

Proteinkomponenten sowie NAD(P)H enthielt, führte zu einer starken Zunahme der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung (b). Dies ließ auf  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Endprodukt der Reaktion schließen.

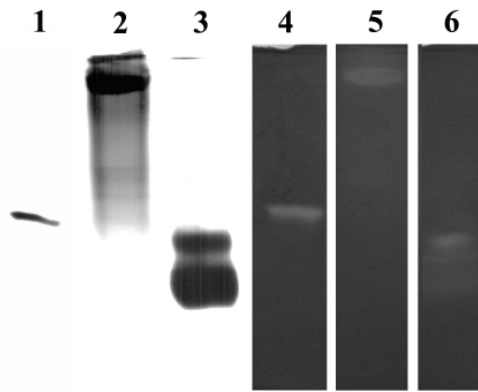
Die vorliegenden Ergebnisse zur Enzymaktivität von Dfx lassen auf eine Beteiligung von Dfx bei der Entgiftung von  $\text{O}_2^-$  in *C. acetobutylicum* schließen. Bei der Reaktion werden unter NADH-Verbrauch Elektronen über NROR, Rd und Dfx unter Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf  $\text{O}_2^-$  übertragen. Dieses Protein kann somit in *C. acetobutylicum* die Funktion der Superoxid-Reduktase in dem von Weinberg *et al.* (2004) für *P. furiosus* beschriebenen Reaktionsweg übernehmen (vgl. Abb. E2).

### **3.4 Untersuchung der Enzymaktivität von reversem Rubrerythrin**

Das generelle Stressprotein Hsp21 wurde als reverses Rubrerythrin identifiziert. Es wird für dieses Protein eine Funktion als NADH-abhängige Peroxidase/Oxidase vermutet. Zusätzliche Proteinfunktionen konnten aber aufgrund diverser weiterer Funktionen, die für normale Rbrs beschrieben wurden, nicht ausgeschlossen werden. Die funktionelle Charakterisierung von revRbr ist im Folgenden beschrieben.

#### **3.4.1 Superoxid-Dismutase Aktivität von revRbr**

Für Rubrerythrine verschiedener Organismen wurde neben der NAD(P)H-Peroxidase auch eine geringe SOD-Aktivität beschrieben. So konnte beispielsweise für Rbr aus *D. vulgaris* SOD-Aktivität in einem Zymogramm nachgewiesen werden (Fournier *et al.*, 2003). Aufgrund dessen wurde auch revRbr auf diese Aktivität hin untersucht. Hierfür fand das gleiche Zymogramm Anwendung, das auch für die Bestimmung einer SOD-Aktivität von Dfx verwendet wurde (s. 3.3.1, 2.17.1). Vorteilhaft war dabei, dass für die Zymogramme nur revRbr aufgereinigt werden musste, da diese Aktivität unabhängig von anderen Proteinfaktoren war. Abbildung R15 zeigt ein solches Zymogramm.



**Abb. R15: SOD-Aktivität von *C. acetobutylicum* revRbr**

12,5 %ige native PAGE (2.11.2). **1 – 3** Coomassie gefärbtes natives Gel. **1** 2,5 µg Fe-SOD *E. coli*; **2** 20 µg gereinigtes *C. acetobutylicum* revRbr; **3** 20 µg gereinigtes *C. acetobutylicum* Dfx; **4 – 6** SOD-Zymogramm nach Beauchamp und Fridovich (1971, 2.17.1), Spurenbelegung wie 1 – 3.

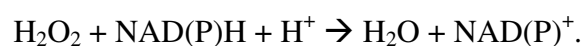
Gereinigtes revRbr (20 µg) zeigte eine klar erkennbare Aktivitätsbande in dem Zymogramm, die der Höhe einer revRbr Bande in einem mit Coomassie gefärbten Gel entsprach (Spuren 2 bzw. 5). Es zeigte sich für revRbr ähnlich wie beim Dfx nur eine geringe SOD-Aktivität (vgl. Spur 5 mit Spur 4 bzw. 6).

Um die Aktivität quantifizieren zu können, wurde zusätzlich ein photospektrometrischer Test durchgeführt (2.17.2.1). Ein ähnliches Experiment wurde bereits für Rbr aus *C. perfringens* durchgeführt. Für dieses Enzym konnte eine Aktivität von 120 U/mg in einem Pyrogallol-abhängigen Test gemessen werden (Lehmann *et al.*, 1996).

RevRbr wurde zudem einem NBT-abhängigen Test unterzogen (2.17.2.1) und zeigte eine spezifische SOD-Aktivität von  $27 \pm 2,5$  U/mg. Diese Aktivität war 3,5 mal niedriger als die der *E. coli* Fe-SOD (100 U/mg) und 45 mal niedriger als die einer SOD vom Rind (1200 U/mg).

### 3.4.2. NAD(P)H-Peroxidase/Oxidase Aktivitäten von *C. acetobutylicum* revRbr

Ausgehend von der Funktion normaler Rbrs bei der Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies in anderen Organismen (Coulter *et al.*, 1999; Coulter und Kurtz, 2001; Weinberg *et al.*, 2004), wurde für revRbr in *C. acetobutylicum* die Aufgabe als endständige Komponente einer NAD(P)H-Peroxidase vermutet, welche folgende Reaktion ausübt:



Dabei müssen Elektronen von NAD(P)H zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  übertragen werden. Im Folgenden wird die Rekonstruktion eines solchen Reaktionsweges für *C. acetobutylicum* dargestellt. Dabei wurde

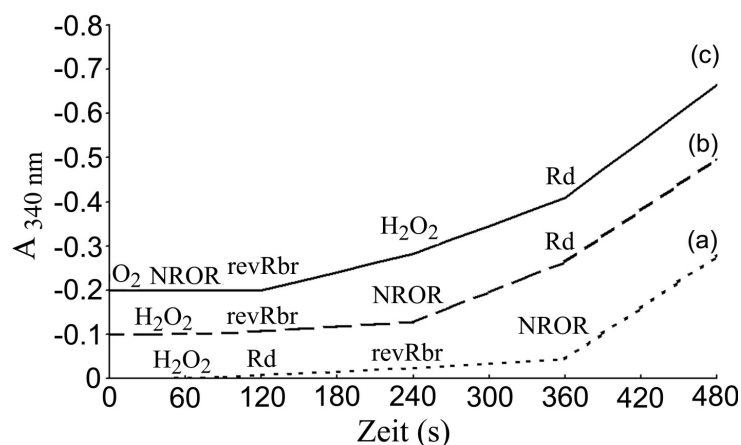


die Funktion von revRbr in dem Entgiftungsweg nachgewiesen sowie die Beteiligung der Proteine Rd und NROR bei der Regeneration von revRbr untersucht.

### 3.4.2.1 Messung des NAD(P)H-Verbrauchs

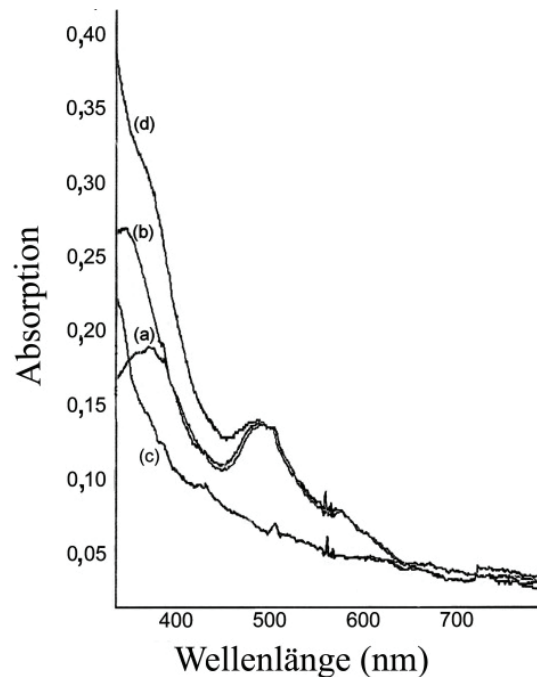
Der NAD(P)H-Verbrauch im Zuge der Entgiftungsreaktion wurde bei 340 nm photometrisch verfolgt, die Durchführung erfolgte wie unter 2.17.2.3 beschrieben. Es stellte sich heraus, dass NAD(P)H-Konsum sowohl mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ , als auch mit  $\text{O}_2$  als Substrat erfolgen konnte (Abb. R16, a und c). In beiden Fällen war NROR ohne Beteiligung von Rd fähig Elektronen auf revRbr zu übertragen (Abb. R16, b und c). Dies zeigte sich auch dadurch, dass NROR oxidiertes revRbr in anaerober Lösung in Anwesenheit von NADH reduzieren konnte (Abb. R17).

Sowohl mit  $\text{O}_2$  als auch mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Substrat bewirkte die Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  Rd eine Verdopplung des NAD(P)H-Verbrauchs (Abb. R16, b und c). Der Zusatz von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu einem aeroben Reaktionsansatz erhöhte ebenfalls den NADH-Verbrauch (Abb. R16, c). Es erfolgte kein NADH-Verbrauch, wenn entweder NROR oder revRbr in dem Ansatz fehlte.



**Abb. R16: NADH-Oxidase/Peroxidase Aktivitäten von revRbr in Abhängigkeit von Rd und NROR**

Aktivitäten wurden als Extinktionsabnahme bei 340 nm infolge von NADH-Verbrauch während der Reaktion photometrisch bestimmt. Der Prämix bestand aus einem anaeroben Puffer aus 50 mM MOPS und 0,1 mM EDTA (pH 7,0), in dem 0,1 mM NADH gelöst war. Alle Proteine (1  $\mu\text{M}$ ) und  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,25 mM) wurden aus anaeroben Stammlösungen zugesetzt. (a) Anaerobe NADH-Peroxidase Aktivität gestartet durch Zugabe von NROR; (b) Verdopplung der anaeroben NADH-Peroxidase Aktivität durch Rd; (c) NADH-Oxidase und NADH-Peroxidase Aktivitäten in aerobem Puffer. Rd, Rubredoxin; revRbr, reverses Rubrerythrin; NROR, NADH:Rubredoxin Oxidoreduktase.

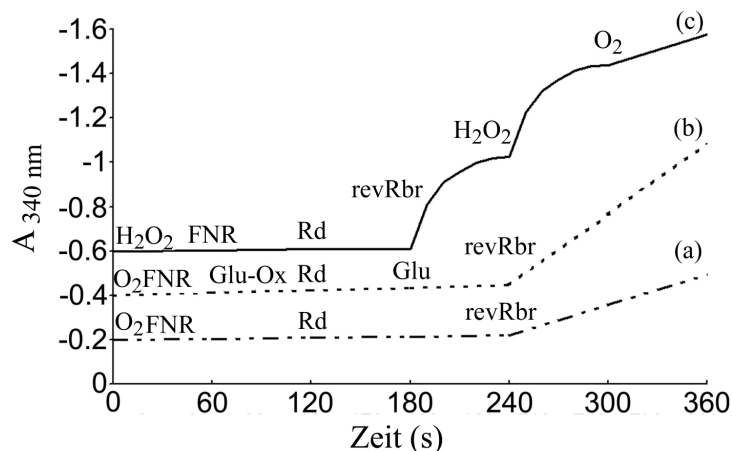


**Abb. R17: Redoxtitration von oxidiertem revRbr**

Absorptionsspektren wurden wie in 2.15.3 beschrieben aufgezeichnet. Spektrum von: (a) 100  $\mu\text{M}$  "as isolated" revRbr; (b) 100  $\mu\text{M}$  "as isolated" revRbr plus 125  $\mu\text{M}$  NADH; (c) Gleiche Probe wie (b) nach Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  NROR; (d) Gleiche Probe wie (c) nach Zugabe von 100 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Alle Lösungen in 50 mM MOPS, 0,1 mM EDTA (pH 7,0).

NADH und *C. acetobutylicum* NROR konnten durch NADPH und das Spinatenzym FNR ersetzt werden. FNR wurde bei der Untersuchung vergleichbarer Systeme in anderen Organismen als Ersatz für den nativen initialen Elektronenüberträger verwendet (Coulter *et al.*, 1999; Coulter und Kurtz, 2001; 3.3.2.2). Auch *C. acetobutylicum* Rd konnte durch FNR unter Verwendung von NADPH als Elektronendonator reduziert werden (2.17.2.3, vgl. 3.3.2.2.1). Im Gegensatz zu NROR konnte FNR jedoch nicht direkt Elektronen auf revRbr übertragen. Rd war bei Verwendung von FNR absolut notwendig für die Peroxidase/Oxidase Aktivität. Wie in Abb. R18 gezeigt, konnte NADPH-Verbrauch nur beobachtet werden, wenn FNR, Rd und revRbr im Reaktionsansatz enthalten waren. Unter aeroben (Abb. R18, a; Oxidase) oder anaeroben (Abb. R18, b; Peroxidase) Bedingungen fand keine Umsetzung von NADPH bei Abwesenheit einer der 3 Proteinkomponenten statt. Produktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch das Glukose/Glukose Oxidase System in aeroben Lösungen verstärkte den NADPH-Konsum (Abb. R18, b). Bei Verwendung von geringen Mengen  $\text{H}_2\text{O}_2$  (25  $\mu\text{M}$ ) in anaeroben Reaktionsansätzen stoppte der NADPH-Umsatz, wenn das  $\text{H}_2\text{O}_2$  umgesetzt war (Abb. R18, c). Der erneute Zusatz der gleichen Menge  $\text{H}_2\text{O}_2$  führte in gleichem Maße zu NADPH-Verbrauch wie zuvor. Wurde ein so behandelter Reaktionsansatz nun einer Sauerstoffatmosphäre ausgesetzt und durchmischt, erfolgte eine Wiederherstellung des

NADPH-Konsums. Letzteres bestätigt die gleichzeitige Funktion von revRbr als NAD(P)H-Peroxidase und als NAD(P)H-Oxidase.



**Abb. R18: NADPH-Oxidase/Peroxidase Aktivitäten von revRbr in Abhängigkeit von Rd und FNR**

Durchführung wie in Abb. R16, wobei NADH durch NADPH und NROR durch FNR ersetzt wurde. (a) NADPH-Oxidase Aktivität; (b) NADPH-Verbrauch in aerobem Puffer unter konstanter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion durch das Glukose/Glukose Oxidase System; (c) NADPH-Verbrauch in anaerobem Puffer nach Zugabe von 25 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Luftdurchmischung. Rd, Rubredoxin; revRbr, reverses Rubrerythrin; FNR, Ferredoxin:NADP<sup>+</sup> Reduktase; Glu-Ox, Glukose Oxidase; Glu, Glukose.

Tabelle R3 beinhaltet die berechneten spezifischen NADH-Peroxidase und NADH-Oxidase Aktivitäten von *C. acetobutylicum* revRbr und ebenso *C. acetobutylicum* RubY (vgl. 3.4.3).

**Tab. R3: NADH-Peroxidase und NADH-Oxidase Aktivität von *C. acetobutylicum* und gereinigten Proteinen**

Quelle \ Aktivität	NADH-Oxidase (mU/mg Protein*)	NADH-Peroxidase (mU/mg Protein <sup>†</sup> )
<i>C. acetobutylicum</i> Wildtyp	16 ± 2	17 ± 2
<i>C. acetobutylicum</i> pTrevrbr3B	24 ± 3	24 ± 2
NROR/RubY	17 ± 2	647 ± 6
NROR/Rd/RubY	137 ± 10	952 ± 18
NROR/revRbr	420 ± 21	660 ± 22
NROR/Rd/revRbr	644 ± 46	993 ± 16

Enzymaktivitäten wurden in einem Puffer aus 50 mM MOPS, 0,1 mM EDTA und 0,1 mM NADH bei pH 7,0 gemessen. Es wurden 1 µM der jeweiligen Proteine oder 100 µg Zelllysatz zugesetzt. Eine Unit ist definitionsgemäß die Proteinmenge, welche die Oxidation von 1 µmol NADH pro Minute verursacht. Die Messwerte stellen Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten dar, bei denen sich die gemessenen Aktivitäten um nicht mehr als 20 % unterschieden.

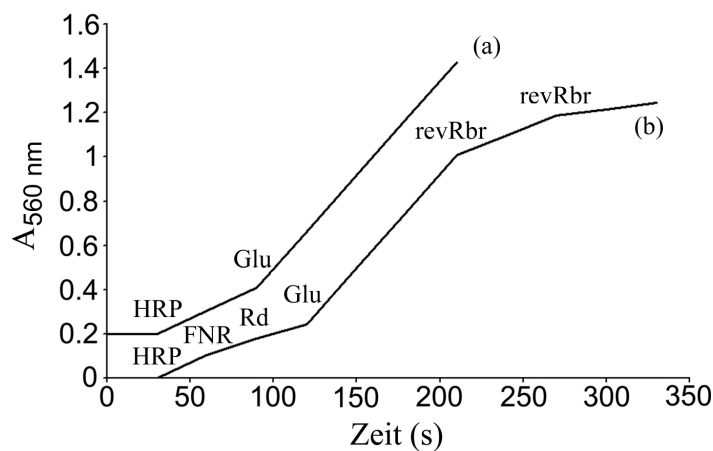
\* NADH-Oxidase Aktivität wurde in aerobem Puffer gemessen.

† NADH-Peroxidase Aktivität wurde in anaerobem Puffer versetzt mit 0,25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gemessen.

### 3.4.2.2 Messung des $\text{H}_2\text{O}_2$ -Verbrauchs

Zusätzlich zur Umsetzung von NAD(P)H (3.4.2.1) während der durch revRbr vermittelten Entgiftungsreaktion  $[\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NAD(P)H} + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{NAD(P)}^+]$  wurde auch der Verbrauch von  $\text{H}_2\text{O}_2$  verfolgt. Hierzu konnte der für die Messung von  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Entstehung im ersten Teilschritt der Reaktion verwendete optisch-enzymatische Test (2.17.2.4, vgl. 3.3.2.2.2) abgewandelt werden. Eine Peroxidase (HRP) setzte dabei Amplex Red in Anwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu Resorufin um. Im Gegensatz zu dem bei der Untersuchung der SOR-Reaktion verwendeten Test wurde hier durch eine Glukose/Glukose Oxidase Reaktion  $\text{H}_2\text{O}_2$  im Ansatz erzeugt (bei der SOR-Reaktion  $\text{O}_2^-$  durch Xanthin/Xanthin Oxidase).

Ein Verbrauch des so erzeugten  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch die NADH-Peroxidase Aktivität von revRbr wirkte sich in verminderter Resorufinbildung aus. Abbildung R19 zeigt, dass diese Reaktion inhibiert wurde, wenn revRbr zusätzlich zu den anderen notwendigen Komponenten NADPH, FNR und Rd zum Ansatz gegeben wurde. Die Hemmung der Reaktion war dabei abhängig von der Menge des zugegebenen revRbr (Abb. R19, b). Dies ließ darauf schließen, dass HRP und die durch revRbr vermittelte Peroxidase Reaktion um das Substrat  $\text{H}_2\text{O}_2$  konkurrieren.

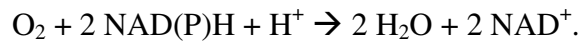


**Abb. R19:  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Verbrauch durch die NADH-Peroxidase Reaktion**

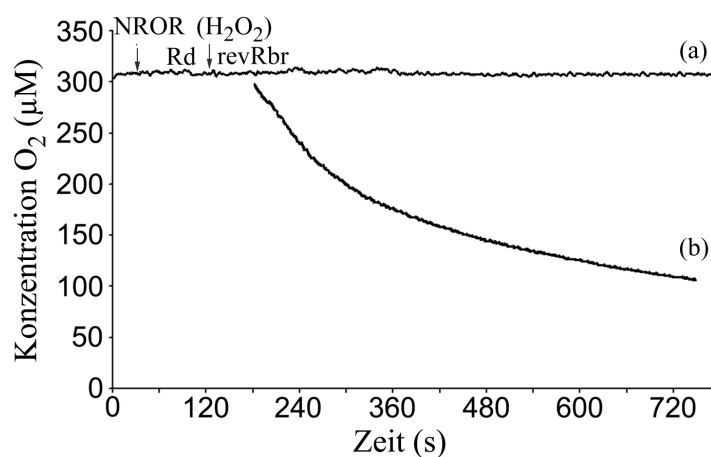
Die Produktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch die Glukose/Glukose Oxidase Reaktion wurde durch das Amplex Red/HRP-System visualisiert (2.17.2.4). Die Entstehung von Resorufin wurde bei 560 nm verfolgt. (a) Kontrollreaktion mit Amplex Red/HRP und Glukose/Glukose Oxidase; (b) Hemmung der Reaktion bei Zugabe von revRbr zu einem Reaktionsansatz der zusätzlich Rd, FNR und NADPH enthielt. Rd, Rubredoxin; revRbr, reverses Rubrerythrin; FNR, Ferredoxin:NADP<sup>+</sup> Reduktase; Glu, Glukose; HRP, Peroxidase aus Meerrettich.

### 3.4.2.3 Messung des Sauerstoffverbrauchs infolge der NADH-Oxidase Aktivität des revRbr

Neben der Untersuchung von NADH- und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Verbrauch (3.4.2.1, 3.4.2.2) konnte in aeroben Messansätzen der Sauerstoffverbrauch bestimmt werden, wobei in diesem Fall revRbr eine NADH-Oxidase Aktivität ausübt. Die zugrundeliegende Reaktion ist folgende:



Die Messung wurde wie unter Punkt 2.16 beschrieben vorgenommen. Die Reaktionsansätze entsprachen denen aus 3.4.2.1. RevRbr ( $1 \mu\text{M}$ ) wurde einem aeroben Messansatz zugesetzt, der auch NROR ( $1 \mu\text{M}$ ), NADH ( $0,1 \text{ mM}$ ) und Rd ( $1 \mu\text{M}$ ) enthielt. Dies bewirkte eine Abnahme der Konzentration des gelösten Sauerstoffs in der Lösung. Die Reaktion verlief zunächst linear. Für diesen Bereich konnte ein Sauerstoffverbrauch von  $12,5 \mu\text{M O}_2$  pro  $\mu\text{mol}$  revRbr pro min berechnet werden (Abb. R20, b). Ein anderes Bild zeigte sich, wenn vor der Zugabe von revRbr  $0,25 \text{ mM H}_2\text{O}_2$  zum Messansatz gegeben wurden. Diese Konzentration entsprach in etwa der Konzentration von Sauerstoff in gesättigten Lösungen (ca. 280 bis  $320 \mu\text{M}$ ). Hier konnte keine Umsetzung von Sauerstoff nachgewiesen werden (Abb. R20, a). Diese Hemmung des Sauerstoffverbrauchs durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Verbindung mit der Beobachtung eines erhöhten NADH-Umsatzes bei Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu aeroben Ansätzen wie unter Punkt 3.4.2.1 (vgl. Abb. R16, c) beschrieben, lässt nur den Schluss zu, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  ein besseres Substrat für revRbr darstellt als  $\text{O}_2$ .



**Abb. R20:  $\text{H}_2\text{O}_2$  inhibiert  $\text{O}_2$ -Verbrauch durch revRbr**

$\text{O}_2$ -Verbrauch konnte unter Verwendung eines Sauerstoffmessgerätes in aeroben Lösungen gemessen werden (2.16). Der Messansatz enthielt  $0,1 \text{ mM}$  NADH,  $1 \mu\text{M}$  NROR und  $0,1 \text{ mM}$  EDTA in  $50 \text{ mM}$  MOPS, pH 7,0. Rd und revRbr (beide  $1 \mu\text{M}$ , Na-Dithionit reduziert) wurden nach Erhalt einer konstanten Blindreaktion zugesetzt. (a)  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $0,25 \text{ mM}$ ) wurde vor revRbr zugesetzt; (b) Reaktion ohne Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Rd, Rubredoxin; revRbr, reverses Rubrerythrin; NROR, NADH:Rubredoxin Oxidoreduktase.

Die vorliegenden Ergebnisse zur Enzymaktivität von revRbr lassen auf eine Beteiligung dieses Proteins bei der Entgiftung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in *C. acetobutylicum* schließen. Bei der Reaktion werden unter NADH-Verbrauch Elektronen über NROR, Rd und revRbr unter Bildung von  $\text{H}_2\text{O}$  auf  $\text{H}_2\text{O}_2$  übertragen. Dieses Protein kann somit in *C. acetobutylicum* die Funktion der NADH-abhängigen Peroxidase in dem von Weinberg *et al.* (2004) für *P. furiosus* beschriebenen Reaktionsweg übernehmen (vgl. Abb. E2). Zusätzlich konnte eine NADH-abhängige Oxidase Aktivität festgestellt werden.

### **3.4.3 NADH-Peroxidase und NADH-Oxidase Aktivität von *C. acetobutylicum* RubY**

Die Verwendung von Sauerstoff und  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch Rubrerythrine konnte in dem Maße wie für *C. acetobutylicum* revRbr unter 3.4.2.1 beschrieben bisher nicht gezeigt werden (vgl. auch Tab. R3). Rbr von *D. vulgaris* zeigte mit Sauerstoff nur 3 % der Aktivität verglichen mit der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Aktivität (Coulter *et al.*, 2000). Um der Frage nachzugehen, ob die Verwendung von Sauerstoff innerhalb der *C. acetobutylicum* Rbrs nicht nur auf die reverse Form beschränkt ist, wurden die für revRbr durchgeführten optisch-enzymatischen Tests auch mit dem normalen *C. acetobutylicum* Rubrerythrin RubY durchgeführt. Im Vorfeld konnte allerdings im Gegensatz zu revRbr für RubY keine erhöhte Transkriptionsrate infolge von oxidativem Stress gezeigt werden. (Hillmann *et al.*, 2006).

Gereinigtes RubY (s. Abb. R6) zeigte in dem NADH-Peroxidase Test (vgl. 3.4.2.1) vergleichbare Aktivitäten zu revRbr (Tab. R3). Auch hier war Rd nicht zwingend für den Ablauf der Reaktion notwendig, konnte aber die Reaktion beschleunigen. Im Bezug auf die Reaktivität mit molekularem Sauerstoff zeigte RubY allerdings erhebliche Unterschiede zu revRbr. Die Aktivität war eher mit der von Rubrerythrinen anderer Organismen vergleichbar. In Abwesenheit von Rd betrug die NADH-Oxidase Aktivität nur 4 % von der des revRbr (bzw. 3 % der eigenen Peroxidase Aktivität). Bei Anwesenheit von Rd fiel die Oxidase Aktivität mit 21 % von der des revRbr schon etwas höher aus (bzw. 14 % der eigenen Peroxidase Aktivität). Im Kontrast dazu konnte die Oxidase Aktivität von revRbr 64 % (bei fehlen von Rd) bzw. 65 % (bei Vorhandensein von Rd) der eigenen Peroxidase Aktivität erreichen.

Die Ergebnisse zur Enzymaktivität von RubY lassen auf eine Beteiligung dieses Proteins bei der Entgiftung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in *C. acetobutylicum* schließen. Der Ablauf der Reaktion entspricht dem für revRbr. Dieses Protein kann somit in *C. acetobutylicum*, genau wie revRbr, die Funktion der NADH-Peroxidase in dem von Weinberg *et al.* (2004) beschriebenen

Reaktionsweg übernehmen (vgl. Abb. E2). RubY wies im Vergleich mit revRbr eine sehr viel geringere NADH-Oxidase Aktivität auf.

### 3.5 Insertionsmutagenese von *C. acetobutylicum* mittels ClosTron-System

Zur Verifizierung der Funktionen der oben untersuchten Enzyme *in vivo* konnten die entsprechenden Gene in *C. acetobutylicum* inaktiviert werden. Dies sollte in Defektmutanten eine niedrigere Toleranz gegenüber oxidativem Stress verursachen. Insertionsmutanten wurden unter Verwendung des kommerziell erhältlichen ClosTron-Systems basierend auf der Insertion eines Gruppe-II-Introns wie unter Punkt 2.13 beschrieben hergestellt (Mohr *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 2003; Heap *et al.*, 2007). Dieses Verfahren ist für ein breites Spektrum von Prokaryoten anwendbar, zu denen auch *C. acetobutylicum* gehört (Heap *et al.*, 2007). In *C. acetobutylicum* wurde das Vektorsystem pMTL007 eingesetzt. Die Expression des auf dem Plasmid enthaltenen Gruppe-II-Introns unterlag der Kontrolle eines durch IPTG induzierbaren *fac*-Promotors. Das Intron konnte durch Austausch einer ca. 350 Bp großen Erkennungssequenz im Intron an verschiedene Zielgensequenzen angepasst werden, wodurch dann die Erkennung und die Integration des Gruppe-II-Introns in das jeweilige Zielgen ermöglicht wurde.

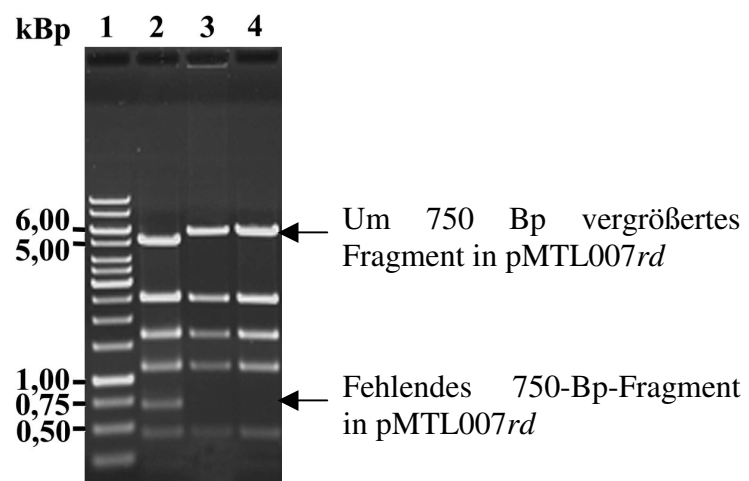
#### 3.5.1 Festlegung der Insertionsorte

Durch Eingabe der Zielgensequenz auf der Targetron Design Seite von Sigma-Aldrich (<http://www.sigma-genosys.com/targetron/>) konnten potenzielle Insertionsstellen in den auszuschaltenden *C. acetobutylicum* Genen (*rd*, *dfx*, *nrer*, *rubY*, *revrbr*) ermittelt werden. Bei der Auswahl der Insertionsorte wurde auf eine hohe Insertionswahrscheinlichkeit (niedriger E-Value) sowie eine Insertion möglichst am Anfang der Gene geachtet. Aufgrund dessen wurden folgende Insertionsorte ausgewählt: *rd* +66/67s, *dfx* +153/154s, *nrer* +448/449a, *rubY* +246/247s, *revrbr* +171/172s. Die Integration des Gruppe-II-Introns konnte auf dem Sense-Strang (s) oder Antisense-Strang (a) erfolgen. Für die Anpassung der Erkennungssequenz des Introns an das jeweilige Zielgen fanden die in Tab. A2 im Anhang ersichtlichen Primer Verwendung.

#### 3.5.2 Modifikation des Ll.LtrB-Introns und Ligation in pMTL007

Die für die Anpassung des Introns an das Zielgen notwendigen Primer wurden wie unter 2.13.1 beschrieben generiert. Zunächst wurde unter Verwendung dieser 3 Primer (IBS1, EBS1d, EBS2) und eines vierten im Kit enthaltenen Universalprimers (EBS Universal) eine

Standard-SOE (splicing by overlap extension) PCR (2.13.2; HO *et al.*, 1989) mit der ursprünglichen 350-Bp-Intronsequenz von pMTL007 als Matritze durchgeführt. Das dadurch entstandene 350-Bp-Amplifikat wurde einer Restriktion mit *Hind*III und *Bsr*GI unterzogen (2.8.7.1). Die dazu notwendigen Restriktionsschnittstellen waren in den jeweiligen IBS1 (*Hind*III) und EBS1d (*Bsr*GI) Primern enthalten. Dieses Fragment konnte nun in einen ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen doppelt restriktierten Vektor pMTL007 ligiert werden (2.8.7.3). Um sicherzustellen, dass tatsächlich dieses veränderte 350-Bp-Fragment in den Vektor integriert wurde, konnten die entstehenden Plasmide einem Testverdau unterzogen werden. Die Originalsequenz des Introns enthielt ursprünglich eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Bsa*AI. In den meisten Fällen führte ein Austausch gegen das veränderte Fragment dazu, dass diese Schnittstelle nicht mehr bestand. Dies war bei den für *rd*, *rubY* und *revrbr* generierten Fragmenten der Fall. Infolgedessen enthielten so veränderte Plasmide eine *Bsa*AI-Schnittstelle weniger als das ursprüngliche pMTL007-Plasmid. Dies resultierte in dem Fehlen einer Bande bei 750 Bp in *Bsa*AI-Restriktionen der neu erzeugten Plasmide und der Vergrößerung eines ca. 5000-Bp-Fragments um diese 750 Bp im Vergleich zu pMTL007. Ein solcher Testverdau ist exemplarisch in Abbildung R21 für das Plasmid pMTL007*rd* gezeigt.



**Abb. R21: Überprüfung der Intronanpassung durch Restriktion**

Gezeigt ist ein 0,8 %iges Agarosegel. 1 Gene-Ruler™-1-kBp-DNA-Ladder; 2 pMTL007 *Bsa*AI-Restriktion; 3 pMTL007*rd* *Bsa*AI-Restriktion; 4 pMTL007*rd* *Bsa*AI-Restriktion.

Beim Fragment für *dfx* wurde hingegen die *Bsa*AI-Schnittstelle nicht mutiert. Trotzdem konnte in dem Fall eine Unterscheidung durch das Fehlen einer *Hinc*II-Schnittstelle erfolgen. Plasmide, die das erwartete Restriktionsmuster zeigten, wurden vor Verwendung in *C. acetobutylicum* zusätzlich sequenziert (2.8.9).



Nach einer Methylierung der Plasmide in *E. coli* ER2275 pANII (Bermejo *et al.*, 1998; Heap *et al.*, 2007) wurden diese in *C. acetobutylicum* transformiert (2.10) und die Erzeugung von Insertionsmutanten wie unter 2.13.3 beschrieben durchgeführt.

### 3.5.3 Identifizierung von *C. acetobutylicum* Mutanten

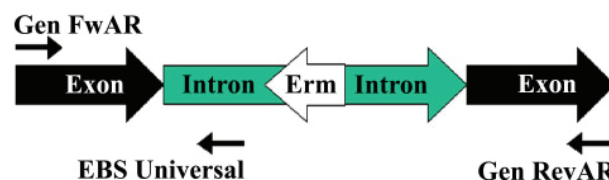
Insertionsmutanten konnten mittels einer durch das Intron vermittelten Erythromycinresistenz selektiert werden. Es ergaben sich pro Platte ca. 20 – 30 erythromycinresistente Kolonien, von denen zunächst 10 für weitere Untersuchungen ausgewählt wurden. Für die Zielgene *rd*, *dfx* und *rubY* konnten so potenzielle Defektmutanten erzeugt werden. Im Falle von *revrbr* wurden 20 Kolonien überprüft. In zwei unabhängigen Versuchen konnten keine potenziellen *nrnr*-Insertionsmutanten erzeugt werden. Die weiteren Experimente zur Verifizierung der Mutanten werden im Anschluss erläutert.

#### 3.5.3.1 PCR-screening

Die Insertion des Gruppe-II-Introns in das gewünschte Zielgen wurde durch Kolonie-PCR überprüft (2.8.8.1). Es konnten verschiedene Primerkombinationen zur Verifizierung der Integration angewandt werden.

Der Nachweis der Insertion mittels PCR zielte dabei auf den Nachweis einer durch die Integration des Introns verursachten Vergrößerung des jeweiligen Gens um 1780 Bp im Vergleich zum Gen des Wildtyps. In einer solchen PCR konnten die gleichen Primer wie für die Klonierung der Gene in den pT-Vektor (s. Tab. A1) verwendet werden.

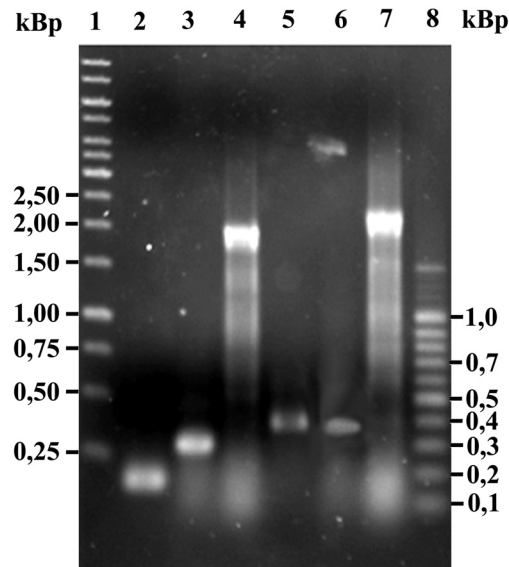
Weiterhin konnte der Nachweis über das Auftreten eines Gen/Intron Übergangs erfolgen. Letzteres wurde bei Insertion in den Sense-Strang des Gens durch die Primerkombination des jeweiligen *Forward*-Primers (s. Tab. A1) und des EBS Universal Primers (5'-CGAAATTAGAACTTGCGTTCAGTAAAC-3'), welcher nur im Intron bindet, bewerkstelligt. Beide Nachweismöglichkeiten sind in Abb. R22 veranschaulicht.



**Abb. R22: Insertionsnachweis**

Dargestellt sind die relativen Positionen der Primer (dünne schwarze Pfeile) zum Nachweis einer Introninsertion. Die dicken schwarzen Pfeile repräsentieren die kodierende Sequenz des Zielgens vor und hinter der Insertion. Der graue Pfeil zeigt das Gruppe-II-Intron (ClosTron) mit der enthaltenen Erythromycinresistenzkassette (Erm), hier weiß dargestellt. Die Pfeile entsprechen nicht den tatsächlichen Größenverhältnissen.

Eine Insertionsstelle im Antisense-Strang (dies war nur bei *nror* der Fall) machte die Verwendung des EBS Universal Primers und eines genspezifischen *Reverse*-Primers notwendig. Eine Insertion des Introns konnte für die Gene *rd*, *dfx*, *rubY* und *revrbr* bestätigt werden (Abb. R23).



**Abb. R23: Verifizierung von Insertionsmutanten mittels PCR**

Dargestellt ist ein 0,8 %iges Agarosegel. **1** Gene-Ruler™-1-kBp-DNA-Ladder; **2** *rd* Gen/Gen-PCR Wildtyp; **3** *rd* Gen/Intron-PCR Insertionsmutante; **4** *rd* Gen/Gen-PCR Insertionsmutante; **5** *dfx* Gen/Gen-PCR Wildtyp; **6** *dfx* Gen/Intron-PCR Insertionsmutante; **7** *dfx* Gen/Gen-PCR Insertionsmutante; **8** GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder.

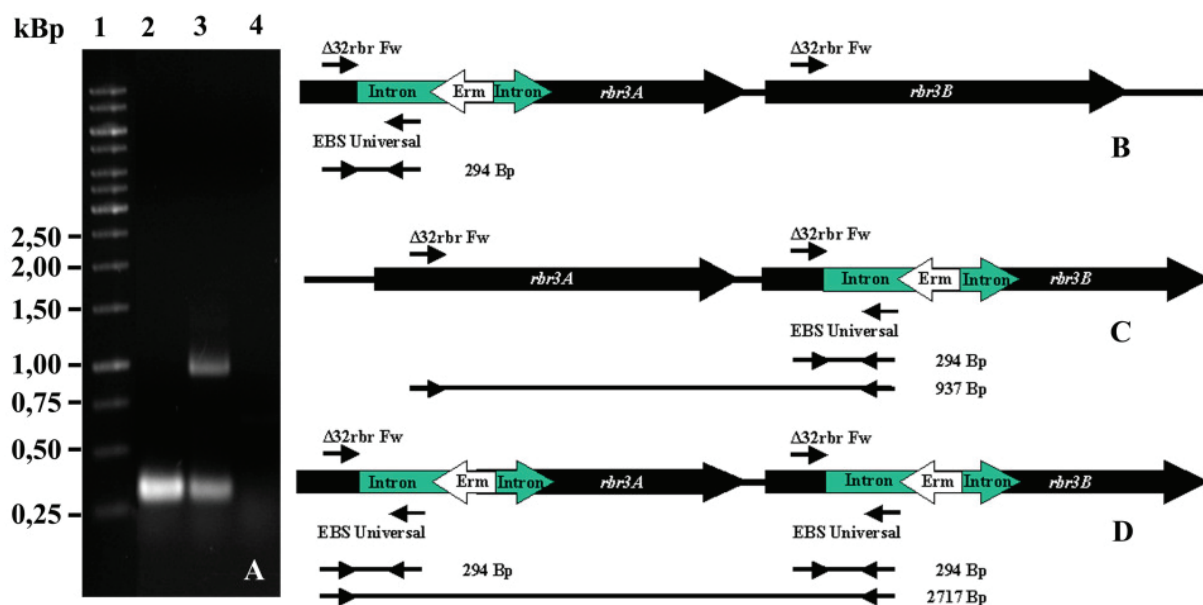
Die Größen der zu erwartenden PCR-Fragmente im Falle einer positiven Insertion sind in Tab. R4 aufgelistet.

**Tab. R4: Berechnete Fragmentgrößen**

Zielgen	Gen/Gen	Gen/Gen	Gen/Intron
	Wildtyp (Bp)*	Insertionsmutante (Bp)*	Insertionsmutante (Bp)*
<i>rd</i>	182	1962	285
<i>dfx</i>	395	2175	372
<i>nror</i>	1159	2939	931
<i>rubY</i>	606	2386	470
<i>revrbr</i>	563	2343	390

\* Die Fragmentgrößen wurden basierend auf den Genomdaten (Nölling *et al.*, 2001) berechnet. Fragmente von Insertionsmutanten sollten um 1780 Bp vergrößert sein.

Beim Nachweis von Insertionsmutanten des *revrbr* kam es bei längeren Elongationszeiten (> 2 min) zum Auftreten von Mehrfachbanden sowohl in der Gen/Gen- als auch in der Gen/Intron-PCR. Dies war in der hohen Sequenzähnlichkeit der beiden benachbarten *revrbr*-Gene begründet (98 % Sequenzidentität; May *et al.*, 2004). Dabei war die Größe der amplifizierten Fragmente abhängig vom Insertionsort des Introns. Aufgrund dieser Besonderheit war es möglich zwischen der Insertion in *rbr3B* oder *rbr3A* zu unterscheiden. Eine schematische Darstellung der Fragmententstehung ist in Abb. R24 gezeigt. Bei der Untersuchung von 20 verschiedenen Integranten konnten zahlreiche Integrationen für *rbr3A*, aber nur eine Integrierte mit Insertion in das *rbr3B*-Gen nachgewiesen werden. Der erfolgreiche Nachweis eines Gen/Intron-Übergangs führte zur Auswahl von 2 Defektmutanten in jeweils einem der *revrbr*-Gene (Abb. R24A).



**Abb. R24: Nachweis von Introninsertionen in *revrbr*-Gene**

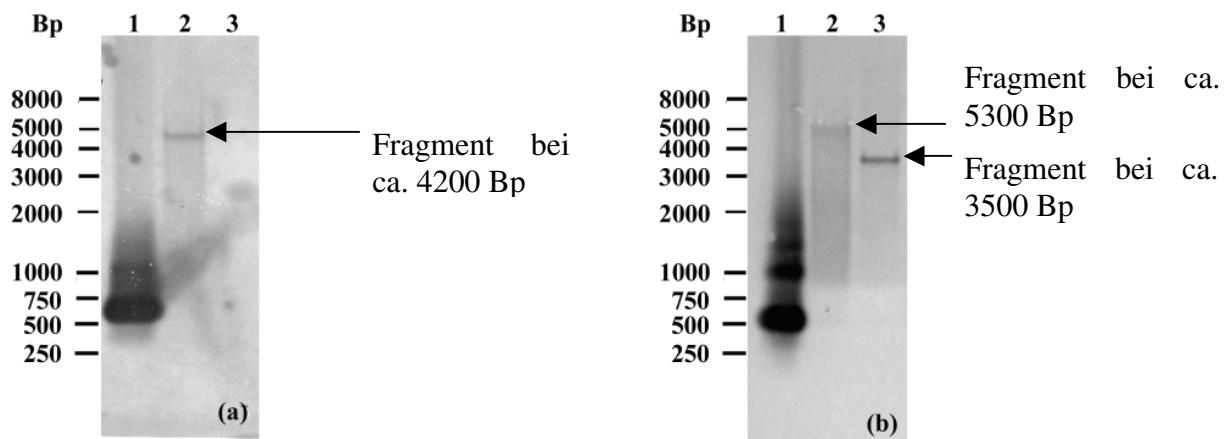
**A** Dargestellt ist ein 0,8 %iges Agarosegel. Alle PCR-Reaktionen wurden mit der Primerkombination  $\Delta 32rbrFw$  als genspezifischer Primer und EBS Universal als intronspezifischer Primer durchgeführt. **1** Gene-Ruler™-1-kBp-DNA-Ladder; **2** *revrbr* Gen/Intron-PCR Insertionsmutante Nr. 14; **3** *revrbr* Gen/Intron-PCR Insertionsmutante Nr. 9; **4** Gen/Intron-PCR Wildtyp; **B** Insertion in *rbr3A* (*cac3598*) kann nur zur Entstehung eines kleinen 294 Bp großen Fragmentes führen; **C** Insertion in *rbr3B* (*cac3597*) führt zur Entstehung eines großen 937-Bp-Fragmentes und eines kleinen 297-Bp-Fragmentes; **D** Insertion in beide *revrbr*-Gene führt zum Auftreten von 2717 Bp und 297 Bp großen Fragmenten.

Bei der *revrbr*-Defektmutante Nr. 9 kam es zum Auftreten eines 294 Bp und eines 937 Bp großen Fragmentes. Dies ließ auf eine Insertion des Introns in das Gen *rbr3B* schließen

(s. Schema Abb. R24C). Für die Defektmutante Nr. 14 konnte nur ein 294-Bp-Fragment amplifiziert werden, was basierend auf dem in Abb. R24 ersichtlichen Schema auf eine Integration in das Gen *rbr3A* zurückzuführen wäre (Abb. R24B). Der Gen/Gen-spezifische Nachweis eines vergrößerten Gens war in keiner der beiden Mutanten erfolgreich, da bei Vorliegen eines Knockouts in einem Gen immer das zweite Gen aufgrund der sehr viel geringeren Größe (563 Bp zu 2343 Bp; s. Tab. R4) mit einer erhöhten Rate amplifiziert wurde (nicht gezeigt). Speziell um eine erfolgreiche Integration in die *revrbr*-Gene unter Verwendung von zwei Methoden nachzuweisen, wurden zusätzlich Southern-Blot Analysen durchgeführt.

### 3.5.3.2 Integrationsnachweis mittels Southern-Blot

Als zusätzliches Verfahren zur Bestätigung der Insertion des Introns in das gewünschte Zielgen fand der Southern-Blot Verwendung. Die DNA (2.8.6.1) der verschiedenen *C. acetobutylicum* Mutanten (*int:rd*, *int:dfx*, *int:rubY*, *int:rbr3A* und *int:rbr3B*) wurde dabei mittels Restriktionsendonukleasen enzymatisch gespalten (2.8.7.1). Dabei erfolgte die Wahl der Restriktionsenzyme basierend auf den Sequenzdaten des Wildtyps (Nölling *et al.*, 2001) so, dass die Größen der chromosomalen Fragmente, welche das nachzuweisende Gen enthielten, zwischen 1000 – 8000 Bp lagen. Die Sondenherstellung, Hybridisierung und Detektion wurden wie unter Punkt 2.8.10 beschrieben durchgeführt. Bei Insertion des Introns in das Zielgen sollten die auftretenden Banden im Southern-Blot für die Mutanten ca. 1800 Bp größer sein als für den Wildtyp. Es wurden die Enzyme *EcoRI*, *EcoRV* und *DraI* für die jeweiligen Einzelrestriktionen verwendet. Die Größen der detektierten Fragmente konnten mittels eines extern mitgeführten, nicht geblotteten Markers anhand der Laufstrecke bestimmt werden. Bei Auftreten einer vergrößerten Bande in den Integranten konnte auf eine erfolgreiche Introninsertion in den gewünschten Locus geschlossen werden. Abb. R25 zeigt die Ergebnisse für *C. acetobutylicum* *int:rbr3B* und *int:dfx*. Der Nachweis der Integration war für diese beiden Stämme bei Verwendung des Restriktionsenzym *EcoRV* erfolgreich. Die Integration des Introns verursachte eine Vergrößerung des durch eine *revrbr*-spezifische Sonde (2.8.10.1) nachgewiesenen Fragmentes um ca. 1800 Bp (*int:rbr3B* ca. 5300 Bp, Wt ca. 3500 Bp). Für *int:dfx* konnte unter Verwendung einer *dfx*-spezifischen Sonde ein im Vergleich zur theoretischen Größe für den Wildtyp um 1800 Bp vergrößertes Fragment nachgewiesen werden (*int:dfx* ca. 4200 Bp, Wt ca. 2400 Bp). Für die anderen *C. acetobutylicum* Integranten (*int:rd*, *int:rbr3A*, *int:rubY*) war der Insertionsnachweis nur durch Gen/Gen- und Gen/Intron-PCR erfolgreich.



**Abb. R25: Southern-Blot zum Integrationsnachweis**

Die Durchführung des Southern-Blots erfolgte wie unter 2.8.10 beschrieben. **(a)** Nachweis der *dfx*-Genregion mittels *dfx*-spezifischer Sonde nach Restriktion der DNA mit *EcoRV*; **1** *dfx* PCR-Fragment als Positivkontrolle; **2** *C. acetobutylicum* int:*dfx* DNA *EcoRV*-Restriktion; **3** *C. acetobutylicum* Wt DNA *EcoRV*-Restriktion; **(b)** Nachweis der *revrbr*-Genregion mittels *revrbr*-spezifischer Sonde nach Restriktion der DNA mit *EcoRV*; **1** *revrbr* PCR-Fragment als Positivkontrolle; **2** *C. acetobutylicum* int:*rbr3B* DNA *EcoRV*-Restriktion; **3** *C. acetobutylicum* Wt DNA *EcoRV*-Restriktion.

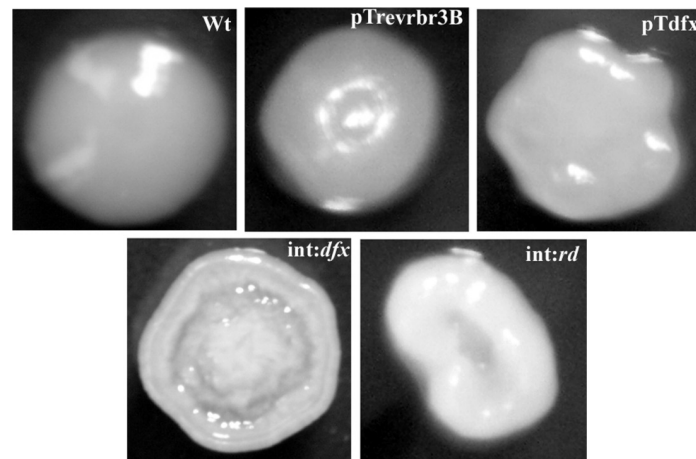
### 3.6 Charakterisierung rekombinanter *C. acetobutylicum* Stämme

Um die in den *in vitro* Tests bestimmten Proteinfunktionen auf ihre biologische Relevanz zu überprüfen, wurden *in vivo* Experimente mit den erzeugten *C. acetobutylicum* Überexpressions- bzw. Defektmutanten durchgeführt. Zur phänotypischen Charakterisierung konnte die Stresstoleranz sowie das Produktspektrum der verschiedenen Stämme herangezogen werden.

#### 3.6.1 Morphologische Charakterisierung der *C. acetobutylicum* Stämme

In mikroskopischen Untersuchungen zeigten sich keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Stämmen bezüglich der Zellmorphologie. Dabei war nach Anzucht in CGM-Medium auffällig, dass die *C. acetobutylicum* Überexpressionsstämme (pTdfx, pTrevrbr3B, pTnror) ausnahmslos eine höhere Beweglichkeit als der Wildtyp oder die *C. acetobutylicum* Defektmutanten (int:*dfx*, int:*rd*, int:*rubY*, int:*rbr3A/B*) zeigten. Alle untersuchten Stämme waren dazu in der Lage auf RCA-Platten (2.6) oder in Minimalmedium zu sporulieren.

Die Kolonimorphologien der Stämme auf RCA-Platten unterschieden sich allerdings teilweise deutlich vom Wildtyp. Abweichende Kolonimorphologien sind in Abb. R27 gezeigt. Das Aussehen der nicht gezeigten Stämme entsprach dem des Wildtyps.



**Abb. R26: Koloniemorphologien verschiedener *C. acetobutylicum* Stämme**

*C. acetobutylicum* Stämme wurden für 2 – 3 Tage auf RCA (Wildtyp) oder RCA<sub>Em20</sub> inkubiert (2.6). Wt, Wildtyp; pTrevrbr3B, revRbr Überexpression; pTdfx, Desulfoferrodoxin Überexpression; int:rd, Rubredoxin Defektmutante; int:dfx, Desulfoferrodoxin Defektmutante.

Morphologisch konnten die Kolonien der *C. acetobutylicum* Stämme folgendermaßen beschrieben werden: Wildtyp – Kegel mit auffälliger Spitze, revRbr-Überexpression (pTrevrbr3B) – konisch, Dfx-Überexpression (pTdfx) – blumenförmig, int:dfx – blumenförmig planar mit äußerem erhabenem Ring, int:rd – Getreidekorn-ähnlich.

Um sicherzustellen, dass es sich bei diesen Kolonien um *C. acetobutylicum* und nicht um Kontaminationen handelte, wurden die Zellen mikroskopiert und einer Kolonie-PCR (vgl. 3.5.3.1 bzw. 2.8.8.1) mit Primern für *C. acetobutylicum* Gene, die spezifisch für ein in dem Stamm nicht verändertes Gen (meist *dfx*) waren, überprüft. Es zeigten sich weder in der Zellmorphologie, noch beim Vorhandensein bzw. der Größe der für die PCR ausgewählten Gene Unterschiede zum *C. acetobutylicum* Wildtyp. Da für keines der untersuchten Gene bzw. Proteine strukturelle Funktionen in der Zelle beschrieben wurden, sind diese unterschiedlichen Morphologien bisher nicht erklärbar.

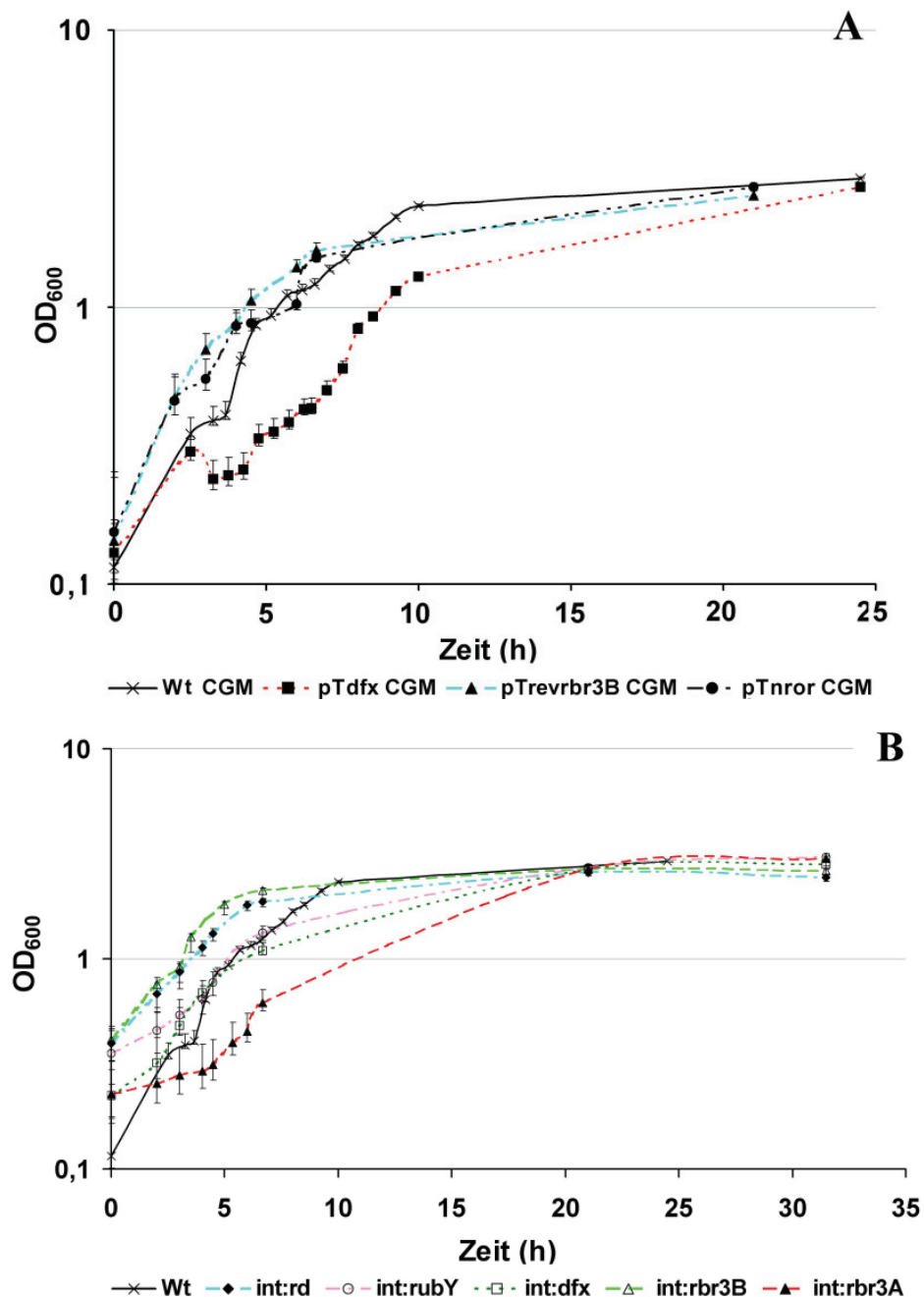
### 3.6.2 Wachstumsphysiologische Experimente

Da es durch das Ausschalten von Genen bzw. die Überexpression von Proteinen zu einer Beeinflussung des Stoffwechsels kommen kann, wurden neben der Bestimmung der Stoffwechselprodukte auch Wachstumsversuche in Komplex- und Minimalmedium durchgeführt. Der Wachstumsverlauf von 10-ml-Flüssigkulturen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen einen entsprechenden Medienleerwert in einem Spektralphotometer verfolgt (2.5, 2.7.1). Zur Bestimmung der optischen Dichte von in Hungate-Röhrchen wachsenden *C. acetobutylicum* Kulturen wurde ein Röhrchenaufsatz genutzt.

### 3.6.2.1 Wachstum im Komplexmedium (CGM)

Die Beimpfung der für die Wachstumsversuche vorgesehenen Kulturen erfolgte aus einer logarithmisch wachsenden Vorkultur desselben Mediums (2.5). Die Beprobung erfolgte nach dem Beimpfen kontinuierlich über 24 h.

Das Wachstum in CGM-Medium ist basierend auf der optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) in Abb. R27 dargestellt.



**Abb. R27: Wachstumskurven in CGM**

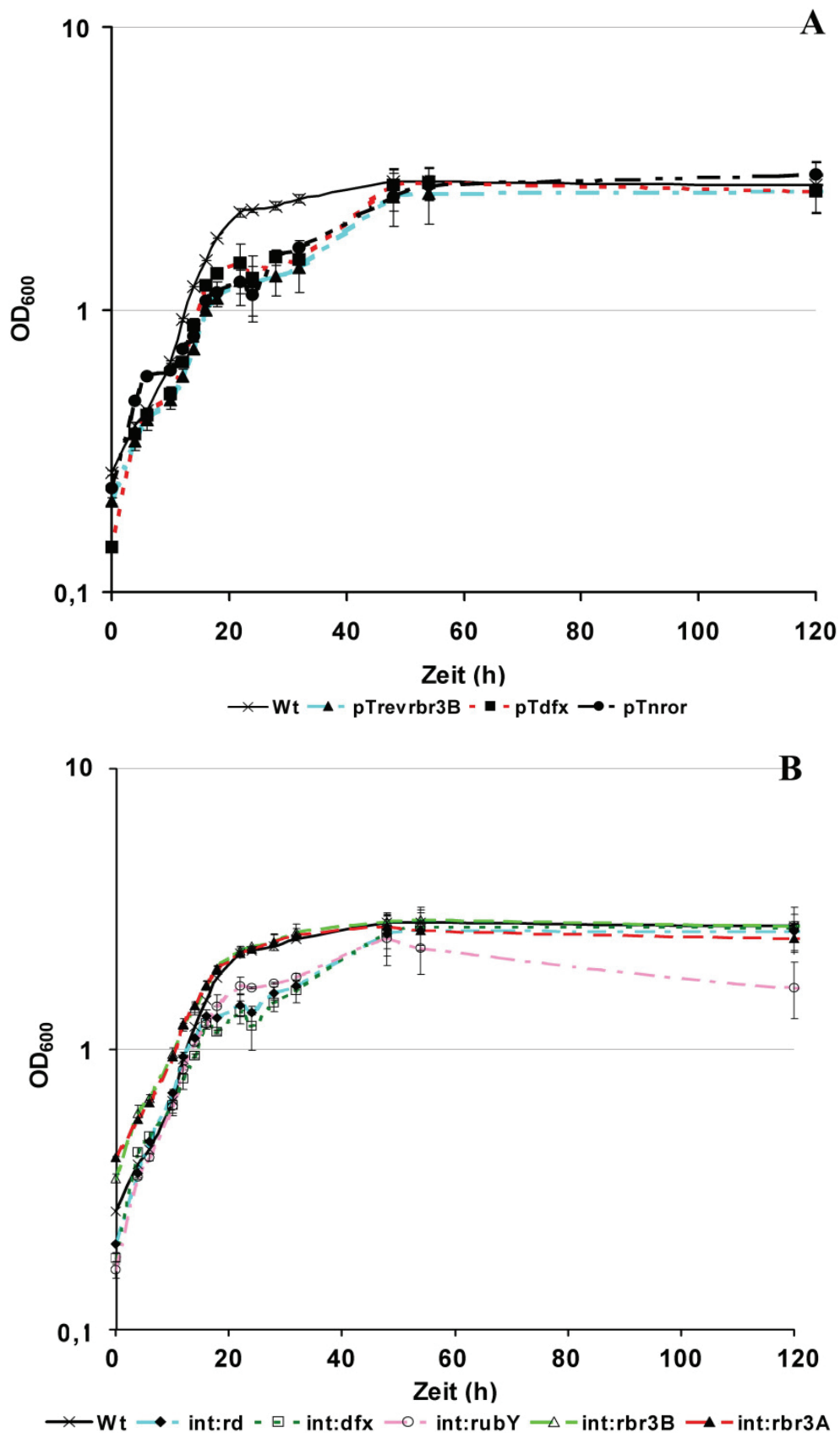
Die Anzucht der *C. acetobutylicum* Stämme erfolgte in CGM wie unter 2.5 beschrieben. Die dargestellten Wachstumskurven für **A** Überexpressionsstämme und **B** Insertionsmutanten stellen Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten dar.

Auffallend war, dass das Wachstum der *C. acetobutylicum* Überexpressionsstämme im Komplexmedium keine wesentlichen Unterschiede zum Wildtyp aufwiesen (vgl. Tab. R5). Die Expression der zusätzlichen Proteine stellte in diesem Medium anscheinend keine besondere Belastung für die Zelle dar. Die *C. acetobutylicum* Defektmutanten *int:rd*, *int:rubY* und *int:rbr3A/B* hingegen zeigten trotz des Defekts, entgegen der Erwartung, sogar ein schnelleres Wachstum als der Wildtyp. Am gravierendsten war dieser Unterschied bei den *C. acetobutylicum revrbr*-Defektmutanten. *C. acetobutylicum int:rbr3A* und *int:rbr3B* hatten offenbar unter anaeroben Bedingungen einen Vorteil, möglicherweise aufgrund des nun durch das Ausschalten der Gene verringerten Grundlevels an revRbr. Dieser ist normalerweise auch in nicht-gestressten Zellen relativ hoch. Die berechneten Wachstumsraten  $\mu$  und Verdopplungszeiten  $t_d$  für CGM-Kulturen sind in Tabelle R5 zusammen mit den Wachstumsdaten in Minimalmedium aufgeführt.

### **3.6.2.2 Wachstum im Minimalmedium (MS-Mes)**

Zusätzlich zur Anzucht in dem Komplexmedium CGM (3.6.2.1) erfolgten auch Versuche in dem Minimalmedium MS-Mes (2.2.1, 2.5). Alle Stämme wurden vor Aufnahme einer Wachstumskurve mindestens 2 mal im gleichen Medium ü. N. angezogen um Verschleppungseffekte zu minimieren. Die Inokulation für den Wachstumsversuch erfolgte aus einer exponentiell wachsenden Kultur mit 0,1 Volumen. Alle 24 Stunden erfolgte zudem eine Probennahme für die Bestimmung der Gärungsprodukte, parallel dazu wurde dann auch erneut die OD<sub>600</sub> bestimmt. Die Wachstumskurven der getesteten *C. acetobutylicum* Stämme in MS-Mes sind in Abb. R28 dargestellt.





**Abb. R28: Wachstumskurven in MS-Mes**

Die Anzucht der *C. acetobutylicum* Stämme erfolgte in MS-Mes wie unter 2.5 beschrieben. Die dargestellten Wachstumskurven für **A** Überexpressionsstämmen und **B** Insertionsmutanten stellen Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten dar.

Nach ca. 24stündigem Wachstum in MS-Mes-Medium wurde die Bestimmung der optischen Dichte durch starke Schleimbildung erschwert, welche in CGM nicht zu beobachten war. Erwartungsgemäß zeigten in diesem Medium hauptsächlich die Überexpressionsstämme ein schlechteres Wachstum. Die zusätzliche Belastung des Zellstoffwechsels durch die Expression der Proteine führte bei Nährstofflimitation zu verringertem Wachstum. Die berechneten Wachstumsraten  $\mu$  sowie die sich daraus ergebenden Verdopplungszeiten  $t_d$  sind in Tab. R5 aufgelistet. Bei dem Stamm *C. acetobutylicum* pTnror ist das langsamere Wachstum wahrscheinlich teilweise auf die Belastung der Zelle durch die Überexpression zurückzuführen. In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von NROR toxisch wirken kann (Grunden *et al.*, 2005).

Die *C. acetobutylicum* Stämme pTrevrbr3B und pTdxf zeigten ebenfalls ein langsames Wachstum als der Wildtyp, vermutlich verursacht durch die zusätzliche Belastung der Zelle bei der Bildung der Proteine revRbr bzw. Dfx.

Die *C. acetobutylicum* Defektmutanten wiesen alle ein sehr ähnliches Wachstum auf. Die Wachstumsraten waren vergleichbar mit denen der Überexpressionsstämme. Eine Ausnahme bildeten die beiden *revrbr*-Defektmutanten, welche zwar etwas langsamer als der Wildtyp wuchsen, jedoch nicht so starke Wachstumseinschränkungen zeigten wie die anderen Defektmutanten. Zudem stimmten die Verdopplungsraten von *C. acetobutylicum* int:*rbr3A* und int:*rbr3B* mit 8,99 h und 9,39 h gut überein.

**Tab. R5: Wachstumsparameter**

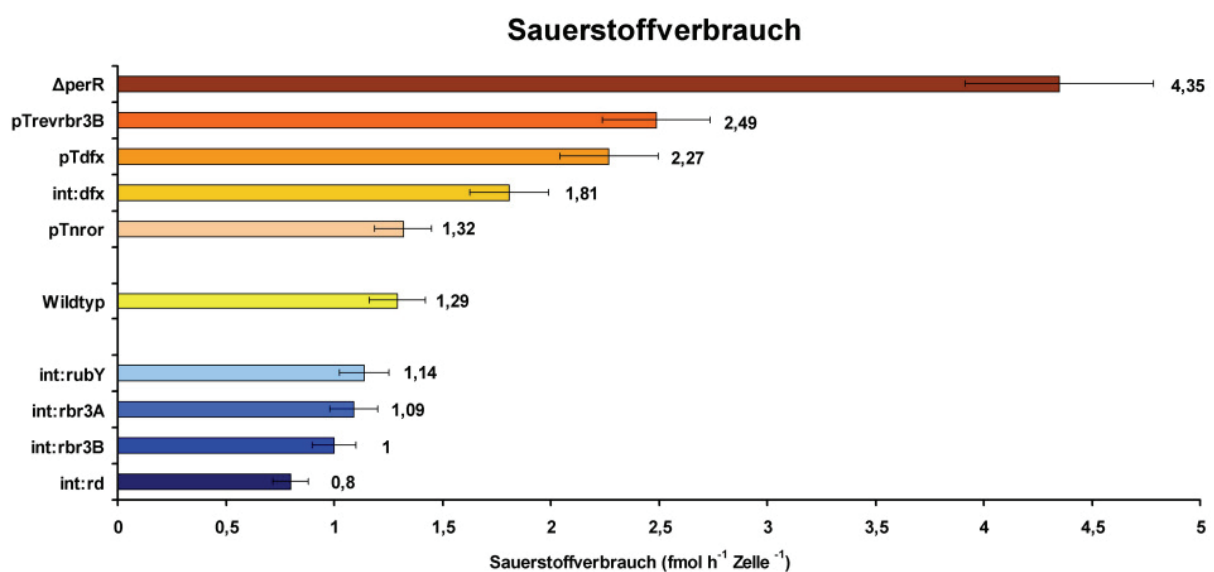
<i>C. acetobutylicum</i> Stamm	Wachstum in CGM*		Wachstum in MS-Mes*	
	Wachstumsrate $\mu$ [h <sup>-1</sup> ]	Verdopplungszeit $t_d$ [h]	Wachstumsrate $\mu$ [h <sup>-1</sup> ]	Verdopplungszeit $t_d$ [h]
Wt	0,21	3,3	0,11	6,24
pTrevrbr3B	0,22	3,1	0,043	15,9
pTdxf	0,22	3,2	0,045	15,5
pTnror	0,21	3,3	0,037	18,6
int: <i>rd</i>	0,24	2,9	0,034	20,2
int: <i>dfx</i>	0,22	3,1	0,037	18,7
int: <i>rubY</i>	0,25	2,8	0,036	19,1
int: <i>rbr3B</i>	0,29	2,4	0,077	8,99
int: <i>rbr3A</i>	0,32	2,1	0,074	9,39

\* Die dargestellten Wachstumsparameter wurden anhand der gemittelten Wachstumsdaten von mindestens zwei unabhängigen Experimenten bestimmt.

Alle *C. acetobutylicum* Stämme erreichten bei Abschluss der Experimente eine OD<sub>600</sub> von ca. 3,0. Der Stamm *C. acetobutylicum* int:rubY zeigte nach Erreichen der maximalen optischen Dichte ein starkes Absinken der optischen Dichte.

### 3.6.3 Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs von Zellkulturen

Da die *in vitro* Experimente zu den Enzymaktivitäten von revRbr neben der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Abwehr auch die Beteiligung an der Sauerstoffentgiftung vermuten ließen, sollte eine Untersuchung der verschiedenen Insertionsmutanten im Hinblick auf deren Sauerstoffkonsum erfolgen und dieser ggf. mit den entsprechenden Überexpressionsstämmen verglichen werden. Genau wie für Enzymgemische unter Punkt 3.4.2.3 beschrieben, konnte eine Messung des Sauerstoffverbrauchs auch in flüssigen Zellkulturen erfolgen. Die Vorgehensweise entsprach der unter 2.16. Es zeigten sich deutliche Unterschiede beim Sauerstoffkonsum der einzelnen *C. acetobutylicum* Stämme. Dabei fiel auf, dass die als Positivkontrolle mitgeführte, von Falk Hillmann erzeugte, *C. acetobutylicum* perR-Defektmutante, bei welcher der Repressor der oxidativen Stressantwort PerR ausgeschaltet war (Hillmann *et al.*, 2008), mit Abstand den höchsten Sauerstoffverbrauch der getesteten Stämme aufwies (Abb. R29).



**Abb. R29: Sauerstoffkonsum verschiedener *C. acetobutylicum* Stämme.**

Der Sauerstoffverbrauch einer bis zur O<sub>2</sub>-Sättigung aerobisierten Kultur wurde wie unter 2.16 beschrieben bestimmt. Der Stamm *C. acetobutylicum* ΔperR (Hillmann *et al.*, 2008) wurde als Kontrolle mitgeführt. Die dargestellten Werte wurden aus mindestens 3 Experimenten berechnet, deren Aktivität sich um nicht mehr als 20 % unterschied.

Danach folgte in anbetracht der *in vitro* Daten zur NAD(P)H-Oxidase Aktivität des revRbr wie erwartet der revRbr Überexpressionsstamm *C. acetobutylicum* pTrevrbr3B. Von den beiden weiteren erzeugten Überexpressionsstämmen zeigte nur der Stamm *C. acetobutylicum*

pTdfx einen im Vergleich zum Wildtyp erhöhten Sauerstoffverbrauch. Der Stamm *C. acetobutylicum* pTnror hingegen zeigte keine veränderte Aktivität. Ein gegenteiliges Ergebnis ergab sich bei Ausschalten der an der Sauerstoffentgiftung beteiligten Proteine. Für die *C. acetobutylicum* Defektmutanten *int:rbr3A/B* und *int:rd* konnten verringerte Sauerstoffumsatzraten gezeigt werden. Bei Fehlen nur eines der beiden *revrbr*-Gene waren die Auswirkungen auf den Sauerstoffkonsum nicht gravierend, da die Expression des anderen Gens vermutlich trotzdem stark genug war dieses Fehlen zu kompensieren.

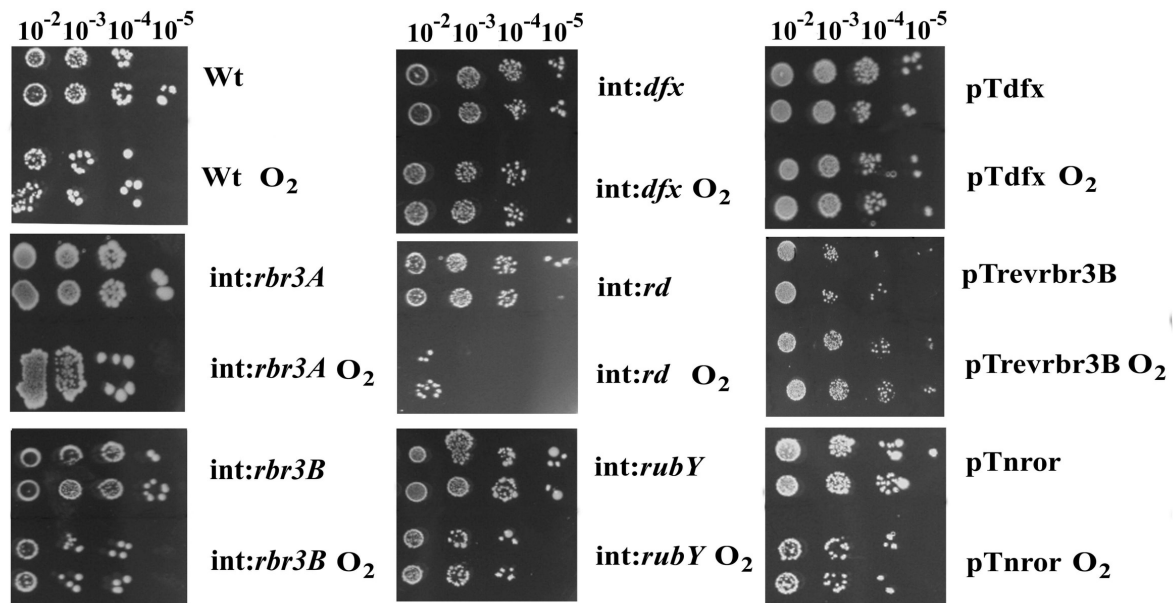
Sobald jedoch die notwendige Elektronentransportkette durch Knockout des *rd*-Gens unterbrochen wurde, zeigte sich eine drastische Verringerung des Sauerstoffverbrauchs auf ca. 60 % des Sauerstoffkonsums des Wildtyps. In *C. acetobutylicum* bestehen mehrere Wege der Sauerstoffentgiftung (Fpr-abhängig oder revRbr-abhängig). Rd ist für die O<sub>2</sub>-Entgiftung durch Fpr zwingend notwendig, wohingegen im Falle des revRbr Rd für die Reaktion in dem *in vitro* Testsystem nicht essenziell war (vgl. 3.4.2.1). Dieser nicht zwingenden Notwendigkeit bei der O<sub>2</sub>-Entgiftung durch revRbr ist es vermutlich geschuldet, dass es bei Knockout des *rd*-Gens nicht zum vollständigen Verlust des Sauerstoffverbrauchs kommt (Hillmann *et al.*, 2009).

### 3.6.4 Stress-Toleranz

Eine veränderte Konzentration der an der Entgiftungsreaktion von ROS beteiligten Proteine infolge von Überexpression oder Knockout der entsprechenden Gene ließ eine veränderte Toleranz gegenüber oxidativem Stress erwarten. Diesbezüglich wurden vergleichende Experimente unter Sauerstoffbegasung und unter Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit den verschiedenen erzeugten *C. acetobutylicum* Stämmen durchgeführt.

#### 3.6.4.1 Überleben nach O<sub>2</sub>-Stress

Exponentiell wachsende CGM-Kulturen (10 ml) wurden, wie unter 2.17.3 beschrieben, mit 130 ml/min Druckluft für 15 min begast. Zeitgleich erfolgte die weitere Inkubation eines Aliquots bei 37 °C in der Anaerobenkammer als Blindwert ohne Begasung. Anschließend wurden Verdünnungen der *C. acetobutylicum* Kulturen in frischem CGM-Medium angefertigt und jeweils 10 µl in 2 Tropfen auf RCA-Platten aufgetropft oder 50 µl der Verdünnungen ausplattiert. Die Kolonie-bildenden-Einheiten (KBE) der letzten beiden bewachsenen Verdünnungsstufen wurden ausgezählt, um die Toleranz gegenüber Sauerstoff einzuschätzen. Abb. R30 zeigt die Ergebnisse eines solchen Tests.



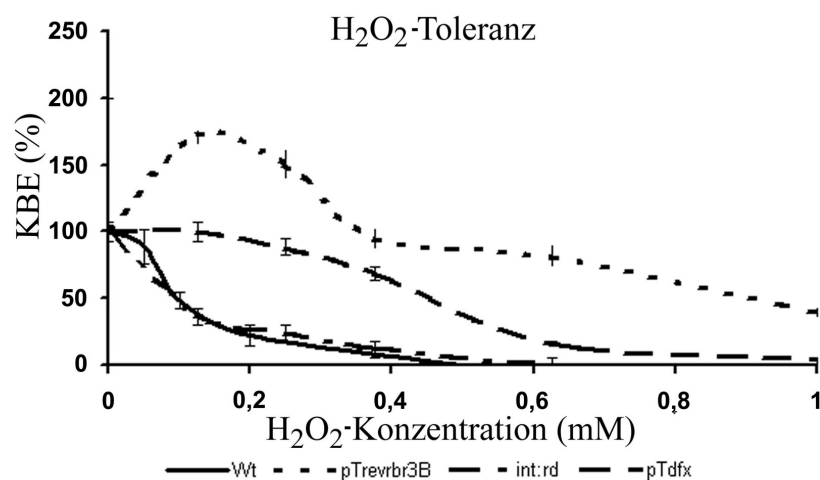
**Abb. R30: Überleben nach Luftbegasung**

*C. acetobutylicum* 10-ml-Kulturen (2.5) wurden für 15 min mit Luft (130 ml/min) begast. 10 µl einer Verdünnungsreihe wurden in 2 Tropfen auf RCA-Platten aufgetropft (jeweils untere 2 Reihen). Als Referenz diente ein nicht begast Aliquot derselben Kultur (jeweils obere 2 Reihen). Die Auswertung erfolgte nach 2 – 3-tägiger Inkubation in der Anaerobenkammer. Wt, Wildtyp; pTrevrbr3B, revRbr-Überexpression; pTdfx, Desulfoferrodoxin Überexpression; int:rd, Rubredoxin Defektmutante, int:dfx, Desulfoferrodoxin Defektmutante, int:rbr3A/B reverses Rubrerythrin Defektmutanten.

Alle *C. acetobutylicum* Defektmutanten zeigten eine schlechtere Sauerstofftoleranz als der Wildtyp. Besonders auffällig war dies bei der *rd*-Defektmutante int:rd mit einer Überlebensrate von ca.  $4 \times 10^{-3}$  im Vergleich zur ungestressten Probe. Für *C. acetobutylicum* int:dfx zeigte sich ebenfalls eine erhöhte Sauerstoffempfindlichkeit. Genau das Gegenteil war für den Stamm *C. acetobutylicum* pTrevrbr3B zu beobachten. Die gestresste Probe bildete mehr Kolonien als der ungestresste Kontrollansatz. Die Expression von Dfx führte ebenfalls zu besseren Überlebensraten im Vergleich zum Wildtyp, nicht jedoch zu besserem Wachstum als die ungestresste Vergleichsprobe. Hingegen zeigten die Expression von NROR (*C. acetobutylicum* pTnror) und der Knockout von *rubY* (*C. acetobutylicum* int:rubY) nur unwesentlich veränderte Sauerstofftoleranzen. Die Empfindlichkeit der *C. acetobutylicum* Stämme gegenüber O<sub>2</sub> konnte folgendermaßen abgestuft werden: pTrevrbr3B  $3,1 \times 10^1$  > pTdfx  $4,4 \times 10^{-1}$  > pTnror  $2,2 \times 10^{-1}$  > Wt  $1,25 \times 10^{-1}$  > int:rbr3A  $1,15 \times 10^{-1}$  > int:rubY  $1,1 \times 10^{-1}$  > int:dfx  $9 \times 10^{-2}$  > int:rbr3B  $9 \times 10^{-2}$  > int:rd  $4 \times 10^{-3}$ .

### 3.6.4.2 Überleben nach $H_2O_2$ -Stress

Um den Effekt der Überexpressionen bzw. Knockouts auf die  $H_2O_2$ -Stresstoleranz von *C. acetobutylicum* *in vivo* zu untersuchen, wurden exponentiell wachsende *C. acetobutylicum* Kulturen einer  $OD_{600}$  von 0,8 – 1,0 zu je 0,5 ml aliquotiert. Wie unter 2.17.3 beschrieben wurden diese Aliquots anschließend mit verschiedenen Konzentrationen  $H_2O_2$  versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C in der Anaerobenkammer konnten 25  $\mu$ l verschiedener Verdünnungsstufen auf RCA ausplattiert werden. Die Bestimmung der KBE erfolgte nach 2 – 3 Tagen. In Abb. R31 sind die Toleranzkurven derjenigen Stämme gezeigt, die vom Wt stark abweichende  $H_2O_2$ -Empfindlichkeiten zeigten.



**Abb. R31: Überleben nach Wasserstoffperoxid Stress**

Dargestellt sind die relativen Überlebensraten von gestressten *C. acetobutylicum* Proben bezogen auf die ungestresste Kontrolle derselben Kultur bei verschiedenen  $H_2O_2$ -Konzentrationen.

Der Stamm *C. acetobutylicum* pTrevrbr3B überlebte bis zu einer  $H_2O_2$ -Konzentration von 0,3 mM mindestens so gut wie die ungestresste Kontrolle derselben Kultur. Es konnte sogar ein besseres Wachstum im Vergleich zur ungestressten Probe unter Zugabe geringer  $H_2O_2$ -Konzentrationen festgestellt werden. Dies stimmt mit den Beobachtungen unter Sauerstoffstress für diesen Stamm überein (vgl. Abb. R30). Im Vergleich zum Wildtyp war die  $H_2O_2$ -Toleranz stark erhöht.

Die Überlebensrate des *C. acetobutylicum* Wildtyps verringerte sich deutlich mit zunehmendem  $H_2O_2$ -Gehalt, ein besseres Überleben des Wt konnte im Vergleich zur ungestressten Probe im getesteten  $H_2O_2$ -Konzentrationsbereich ( $> 0,1$  mM) nicht beobachtet werden. Der Wildtyp war nicht fähig Konzentrationen größer als 0,5 mM zu überleben,

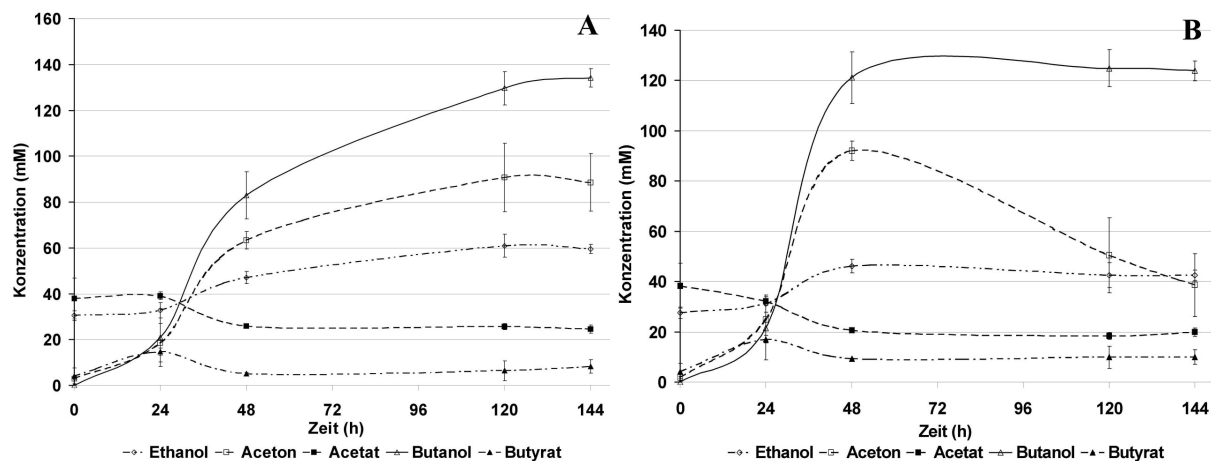
wohingegen bei *C. acetobutylicum* pTrevrbr3B bei 0,8 mM noch 80 % der KBE der ungestressten Probe vorhanden waren.

*C. acetobutylicum* pTdfx zeigte ein ähnliches Bild wie *C. acetobutylicum* pTrevrbr3B, jedoch war der Effekt schwächer. Bei 0,4 mM lag die Überlebensrate bei 70 %, bei Konzentrationen > 0,8 mM waren keine Kolonien mehr auf den Platten vorhanden.

Als einzige *C. acetobutylicum* Defektmutante zeigte int:rd einen Unterschied in der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Toleranz im Vergleich zum Wildtyp. Dies war besonders im niedrigkonzentrierten Bereich der Fall (< 0,2 mM). Bei höheren Konzentrationen entsprachen die Überlebensraten aber wieder denen des Wildtyps.

### **3.6.5 Veränderungen im Produktspektrum durch Mutationen und oxidativen Stress**

Die Entgiftungswege von ROS in *C. acetobutylicum* sind offenbar zu einem Großteil abhängig von NADH. Da der NADH-Spiegel in der Zelle aber maßgeblichen Einfluss auf die Bildung der Stoffwechselendprodukte hat (Morris und O'Brien, 1971), wurde ein Einfluss von Sauerstoff auf die gebildeten Stoffwechselendprodukte vermutet. Die Auswirkungen der Gabe geringer Mengen Sauerstoff zu den Kulturen sowie der Einfluss der veränderten Expression der an der ROS-Entgiftung beteiligten Proteine wurden hierzu in MS-Mes-Medium (10 ml) untersucht. Die Anzucht von 2 Parallelkulturen erfolgte bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0. Anschließend wurde das Kulturgefäß (Hungate) von einer der 2 Kulturen geöffnet und durch eine sterile Alukappe ersetzt. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte zudem aus beiden Kulturen die erste Probennahme von 0,5 ml zur späteren gaschromatographischen Bestimmung der Stoffwechselendprodukte. Der abzentrifugierte Kulturüberstand wurde bis zur Messung bei – 20 °C gelagert. Die anaerobe Kultur wurde weiterhin bei 37 °C inkubiert, die aerobe Kultur hingegen über die weitere Versuchszeit im Schüttelschrank bei 160 UpM und einer Neigung von 45 ° bei 37 °C geschüttelt. Weitere Probennahmen erfolgten für 7 Tage alle 24 Stunden. Exemplarisch ist in Abb. R32 der zeitliche Verlauf des Produktspektrums von *C. acetobutylicum* int:rubY dargestellt.



**Abb. R32: Produktspektrum von *C. acetobutylicum* int:rubY in MS-Mes-Medium mit und ohne Applikation von O<sub>2</sub>**

Die Kulturen wurden in Hungate-Röhrchen mit MS-Mes (10 ml) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 angezogen und anschließend mit oder ohne Aerobisierung weiter inkubiert. Die Probenahmen erfolgten über einen Zeitraum von 7 Tagen. Die Konzentrationen von Säuren und Lösungsmitteln wurden gaschromatographisch bestimmt (2.7.2). **A** Produktspektrum von *C. acetobutylicum* int:rubY nach anaerober Inkubation; **B** Produktspektrum von *C. acetobutylicum* int:rubY nach aerober Inkubation.

Für die weiteren untersuchten Stämme sind die Produktkonzentrationen nach 48 Stunden anaerober bzw. aerober Inkubation in Tab. R6 aufgelistet. Darstellungen des Verlaufs der Produktspektren der einzelnen Stämme finden sich zudem im Anhang in Abb. A4. Bei allen untersuchten *C. acetobutylicum* Stämmen zeigte sich ein deutlicher Einfluss von Sauerstoff auf den zeitlichen Verlauf der Produktbildung. Folgende Feststellungen können getroffen werden: Sauerstoff führte bei allen Stämmen zu schnellerer Lösungsmittelbildung. Unter Sauerstoffapplikation wurden schon nach 48 Stunden Lösungsmittelkonzentrationen erreicht, die bei anaerober Inkubation erst nach ca. 96 Stunden gemessen werden konnten. Sowohl Butanol, aber im besonderen auch Aceton wurden durch das Schütteln aus dem Medium ausgetrieben. Dies war bei Verschluss anaerob wachsender Kulturen mit Septen nicht zu beobachten. Aufgrund dieses Phänomens lassen sich die Endkonzentrationen der Lösungsmittel nicht vergleichen. Solange in der Kultur jedoch ausreichend Aceton und Butanol gebildet wurde, reicherten sich diese Produkte in der Kultur an. Dies war bei aerober Inkubation bis zu 72 Stunden zu beobachten. In aneroben *C. acetobutylicum* Kulturen stieg die Konzentration der Lösungsmittel über den gesamten Testverlauf an. Nach 48 Stunden aerober Inkubation waren in Vergleich zur anaeroben Anzucht durchschnittlich 37 % mehr Butanol und 38 % mehr Aceton in den Kulturen vorhanden. Die maximal erreichten Lösungsmittelkonzentrationen am Ende der Inkubationszeit bei anaerober Inkubation waren



ebenfalls bei allen Stämmen vergleichbar. Sie lagen zwischen 120 mM und 140 mM (Butanol) bzw. 90 mM und 110 mM (Aceton).

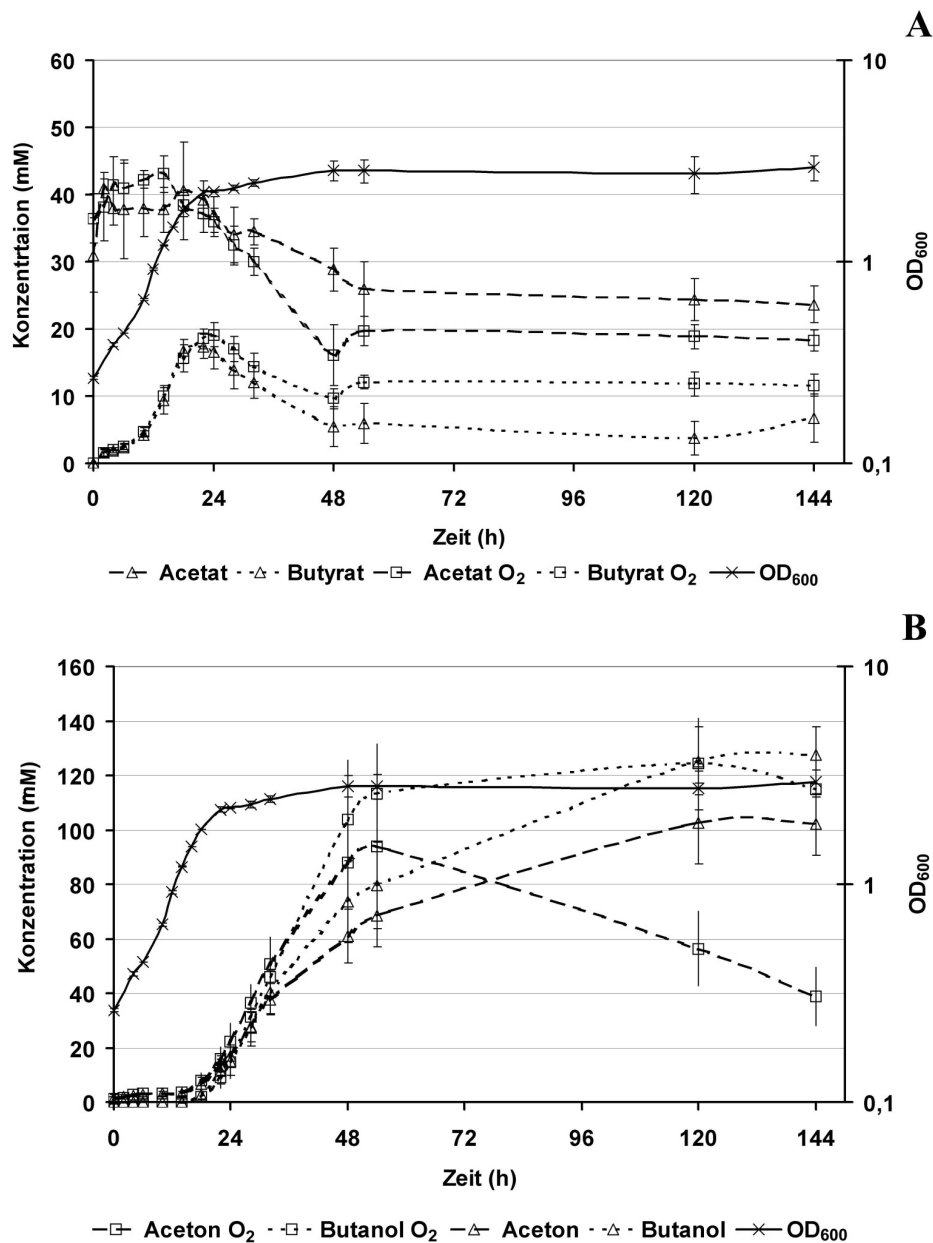
**Tab. R6: Einfluss von Sauerstoff auf die Produktbildung bei verschiedenen *C. acetobutylicum* Stämmen. In der Tabelle angegeben sind Produktkonzentrationen nach 48 h in mM.**

Stamm	Wt			pTrevrbr3B			pTdfx		
	– O <sub>2</sub>	+ O <sub>2</sub>	Ind. <sup>1</sup>	– O <sub>2</sub>	+ O <sub>2</sub>	Ind. <sup>1</sup>	– O <sub>2</sub>	+ O <sub>2</sub>	Ind. <sup>1</sup>
Butanol	68 ± 7	91 ± 1	1,34	52 ± 10	95 ± 3	1,83	74 ± 6	98 ± 14	1,32
Aceton	52 ± 5	75 ± 8	1,44	44 ± 4	70 ± 13	1,6	54 ± 12	80 ± 17	1,48
Butyrat	4 ± 1	8 ± 1	2	12 ± 1	9 ± 1	0,75	5 ± 2	10 ± 1	2
Acetat	27 ± 3	14 ± 4	0,52	33 ± 1	17 ± 4	0,52	31 ± 3	22 ± 6	0,71
	pTnror			int:rd			int:dfx		
Butanol	50 ± 15	67 ± 1	1,34	64 ± 10	91 ± 0	1,42	67 ± 1	87 ± 3	1,3
Aceton	40 ± 17	53 ± 6	1,33	53 ± 17	69 ± 7	1,3	52 ± 9	67 ± 12	1,29
Butyrat	9 ± 4	12 ± 0	1,33	9 ± 0	11 ± 1	1,22	7 ± 1	11 ± 1	1,57
Acetat	33 ± 4	25 ± 6	0,76	32 ± 1	25 ± 5	0,78	27 ± 5	25 ± 1	0,92
	int:rubY			int:rbr3A			int:rbr3B		
Butanol	83 ± 18	121 ± 23	1,46	93 ± 13	111 ± 12	1,2	82 ± 0	103 ± 17	1,26
Aceton	63 ± 13	92 ± 26	1,46	60 ± 0	80 ± 19	1,33	58 ± 7	75 ± 21	1,29
Butyrat	5 ± 4	9 ± 0	1,8	5 ± 0	9 ± 0	1,8	5 ± 1	9 ± 1	1,8
Acetat	26 ± 3	21 ± 2	0,81	27 ± 3	18 ± 3	0,67	27 ± 1	13 ± 3	0,48
				Durchschnitt <sup>2</sup>					
Butanol				70 ± 9	96 ± 8	1,37			
Aceton				53 ± 9	73 ± 14	1,38			
Butyrat				7 ± 2	10 ± 1	1,43			
Acetat				29 ± 3	20 ± 4	0,69			

Die Produktkonzentrationen wurden in zwei unabhängigen Experimenten gaschromatographisch bestimmt (2.7.2). Die Anzucht und Analyse der Stämme erfolgte wie unter 2.5 beschrieben. **1** Berechnete Induktion bei aerober Inkubation; **2** Zur besseren Verdeutlichung des Effekts wurden die Daten zur Produktkonzentration der 9 verschiedenen Stämme nach 48 h zusammengefasst (n = 4).

Unter aeroben Bedingungen verschob sich das Acetat/Butyrat-Verhältnis hin zum Butyrat. Durchschnittlich war bei aerober Inkubation nach 48 Stunden 43 % mehr Butyrat und 31 % weniger Acetat vorhanden. Bei aerober Anzucht zeigte sich ein schnellerer Abbau von Acetat, Butyrat wurde jedoch im Vergleich zu anaerober Inkubation weniger verstoffwechselt (Abb. R33). Die Konzentrationen von Butyrat lagen nach aerober Anzucht somit am Ende der 7tägigen Inkubationszeit höher, die Acetatgehalte niedriger als bei anaerober Inkubation.

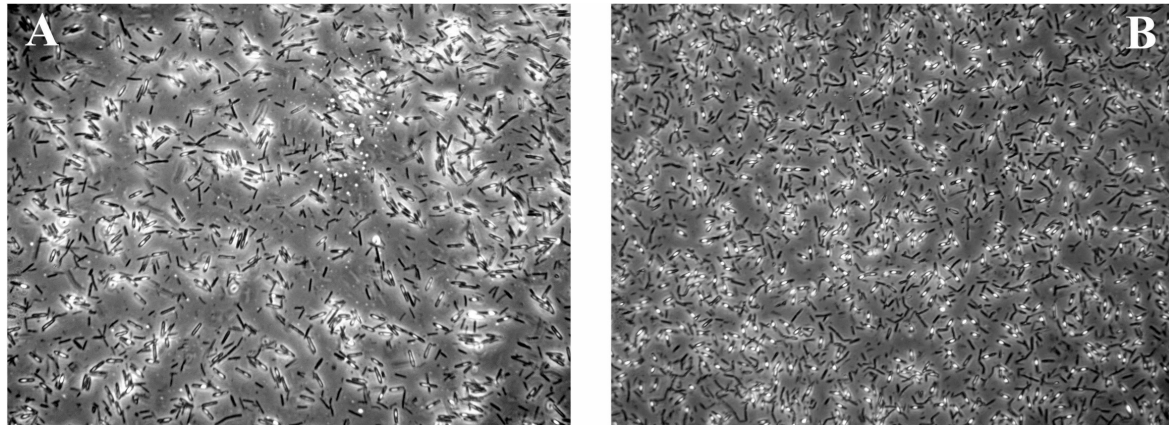
Da die Daten aller *C. acetobutylicum* Stämme ein sehr ähnliches Bild ergaben, wurden zur Verdeutlichung des vorhandenen Trends die entsprechenden Messwerte mit und ohne Sauerstoff in den Diagrammen in Abb. R33 zusammengefasst und gemittelt (s. auch Tab. R6 Durchschnitt).



**Abb. R33: Produktspektren der Gesamtheit der *C. acetobutylicum* Stämme in MS-Mes-Medium mit und ohne Applikation von O<sub>2</sub>**

Die *C. acetobutylicum* Stämme wurden in Hungate-Röhrchen mit MS-Mes (10 ml) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 angezogen und anschließend mit oder ohne Aerobisierung weiter inkubiert. Die Probenahmen erfolgten alle 24 h über 7 Tage. Die Konzentrationen von Säuren und Lösungsmitteln wurden gaschromatographisch bestimmt (2.7.2). Zur besseren Verdeutlichung des Effekts wurden die Daten zur Produktkonzentration von 9 verschiedenen Stämmen (pro dargestelltem Zeitpunkt je 18 Werte für aerobe bzw. anaerobe Inkubation von *C. acetobutylicum* Stämmen) zusammengefasst und gemittelt. Die Produktspektren der einzelnen Stämme sind im Anhang in Abb. A4 ersichtlich. Die dargestellten Wachstumskurven stellen nur das Wachstum des *C. acetobutylicum* Wildtyps bei anaerober Inkubation dar. **A** Säuren (gemittelt); **B** Lösungsmittel (gemittelt).

Bei mikroskopischer Betrachtung der Proben nach 48 h zeigte sich zudem bei allen Stämmen eine beschleunigte Sporulation bei aerober Inkubation im Vergleich zu anaerob wachsenden Kulturen. Dies ist exemplarisch in Abb. R34 für dem *C. acetobutylicum* Wildtyp dargestellt.



**Abb. R34: Sporulation von *C. acetobutylicum* ATCC 824 (Wt) nach 48 h in MS-Mes-Medium mit und ohne Applikation von O<sub>2</sub>**

Die Kulturen wurden in Hungate-Röhrchen (10 ml) mit MS-Mes bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 angezogen und anschließend mit oder ohne Aerobisierung weiter inkubiert. Nach 48stündiger Inkubation wurde jeweils eine Probe lichtmikroskopisch untersucht (400x Vergrößerung). **A** *C. acetobutylicum* Wt nach 48 h anaerober Inkubation; **B** *C. acetobutylicum* Wt nach 48 h aerober Inkubation.

Es war deutlich ein Anstieg der Anzahl sporulierender Zellen zu beobachten. In anaeroben Kulturen lagen zu dem Zeitpunkt ca. 20 % der Zellen als Vorsporen vor. Dieser Wert erhöhte sich in aeroben Kulturen auf ca. 70 %. Eine statistische Auswertung dieser Sporulationsdaten ist nicht erfolgt.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte eindeutig eine Induktion der Lösungsmittelbildung unter Sauerstoffstress nachgewiesen werden. Dabei wurden nur Unterschiede zwischen aerober und anaerober Inkubation nachgewiesen. Die einzelnen untersuchten *C. acetobutylicum* Stämme zeigten zwar beim Wachstum Verzögerungen, die Produktbildung verlief allerdings analog dem Wildtyp. Zudem ergaben sich in allen Kulturen Hinweise auf eine beschleunigte Sporulation unter den in diesen Experimenten vorliegenden moderat aeroben Bedingungen. Um einen Einfluss auf die Sporulation zu verifizieren, bedarf es allerdings noch zusätzlicher Untersuchungen. Es konnte somit kein Einfluss von Knockout oder Überexpression der an der oxidativen Stressabwehr beteiligten Proteine auf die Produktbildung oder Sporulation nachgewiesen werden.

## 4 Diskussion

Das vorrangige Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Funktion reverser Rubrerythrine bei der oxidativen Stressabwehr von *C. acetobutylicum*. Gleichzeitig galt es mögliche Interaktionspartner des revRbr zu identifizieren. Die erzielten Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

### 4.1 Aufreinigung der verschiedenen Proteine

Für die dazu notwendigen *in vitro* Tests mussten die potenziell beteiligten Proteine in *E. coli* DH5 $\alpha$  Wirtszellen exprimiert und daraus aufgereinigt werden. Die „open reading frames“ (ORF) *cac2575* (*rubY*), *cac2448* (*nrer*), *cac2450* (*dfx*), *cac2776* (*rd*), *cac3018* (*rbr2*), *cac3597* (*rbr3B*) wurden amplifiziert und in zwei verschiedene Vektorsysteme (pASK-IBA- und pT-Vektor) kloniert. Mit Ausnahme des Gens *rbr2*, welches nur erfolgreich in einen IBA3 Vektor (pI3rbr2) kloniert wurde, konnten für alle oben genannten ORF's mit beiden Vektorsystemen Klone erzeugt werden. Die korrekte Amplifikation der Fragmente sowie deren korrekter Einbau in die Vektoren, wurde durch Sequenzierung bzw. Restriktionsanalysen nachgewiesen (3.1.4).

Da in vorherigen Arbeiten (Riebe, 2005) eine Expression von revRbr mit Hilfe von IBA-Vektoren bei der Aufreinigung nur zu sehr geringen Ausbeuten führte, wurde auf erneute Expressionsversuche von revRbr mit dem pASK-IBA System verzichtet. In Proteinextrakten von *E. coli* Stämmen die Derivate des pASK-IBA3 Vektors enthielten, waren mit Ausnahme von pI3rubY, pI3dfx und pI3rd keine eindeutig induzierten Banden nach der Induktion nachzuweisen (vgl. 3.2.1). Eine Aufreinigung der Fusionsproteine war nur für Rd und Dfx unter Verwendung dieses Vektorsystems erfolgreich. Dabei wurden Proteinausbeuten von 1 mg Rd bzw. 3 mg Dfx aus einer 500-ml-Kultur erreicht.

Im Laufe dieser Arbeit stellte sich das pT-Vektorsystem als wesentlich ergiebiger und zuverlässiger bei der Expression von Proteinen aus *C. acetobutylicum* heraus. Dies zeigte sich besonders bei der Überexpression von revRbr.

Der in dem pT-Vektor verwendete *thl*-Promotor war hervorragend dazu geeignet, eine Genexpression sowohl in *E. coli* als auch in *C. acetobutylicum* zu erzielen. Hierbei zeigte sich, dass (mit Ausnahme der Expressionen von revRbr mittels pTrevrbr3B) in keinem der pT-plasmidtragenden Klone (*E. coli* oder *C. acetobutylicum*) eine zusätzliche Bande infolge der Bildung des zusätzlichen Proteins im Vergleich zum jeweiligen Proteinmuster der Referenz (*E. coli* DH5 $\alpha$  oder *C. acetobutylicum* ohne pT-Plasmid) zu beobachten war. Trotzdem war eine Aufreinigung der Proteine revRbr (5 mg), Rd (3,5 mg), Dfx (2,0 mg),

NROR (1,5 mg) und RubY (0,4 mg) aus *E. coli* Kulturen (500 ml) mit hohen Ausbeuten möglich. Die Ausbeuten waren in den Fällen, bei denen für eine Proteinexpression sowohl *E. coli* als auch *C. acetobutylicum* Überexpressionsstämme vorlagen (Dfx, NROR und revRbr), bei Aufreinigung aus den *E. coli* Stämmen höher. Hierbei spielt vermutlich die Kopienzahl der Plasmide in der Zelle die entscheidende Rolle. Der in *E. coli* verwendete Replikationsursprung führt zu einer hohen Kopienzahl des Plasmids in einer *E. coli* Zelle. Dagegen bewirkt der in *C. acetobutylicum* verwendete Replikationsursprung eine wesentlich geringere Kopienzahl des Plasmids. Zum Anderen spielt die Aktivität des verwendeten *thl*-Promotors eine Rolle. In *E. coli* wurde die Aktivität bisher nicht quantifiziert, für *C. acetobutylicum* konnte jedoch gezeigt werden, dass bei Überexpression von HydA mit diesem Vektor die Aufreinigungsausbeute bei Austausch des *thl*-Promotors gegen den *hydA*-Promotor um das 10fache gesteigert werden konnte (letzterer ist in *C. acetobutylicum* ca. 14 mal aktiver; Girbal *et al.*, 2005). Eventuell könnte der *thl*-Promotor in *E. coli* z. B. durch Wegfall von Regulationsmechanismen sogar besser abgelesen werden als in seinem Ursprungsorganismus *C. acetobutylicum*. Weiterhin könnte bei der Proteinausbeute der Aufschluss der Zellen mittels Ultraschall bei *C. acetobutylicum* Zellen ein limitierender Faktor gewesen sein. Da *E. coli* als Gram-negatives Bakterium eine wesentlich dünnere Zellwand besitzt als der Gram-positive Organismus *C. acetobutylicum*, waren für letzteren viel längere Beschallungszeiten notwendig (2.14.2).

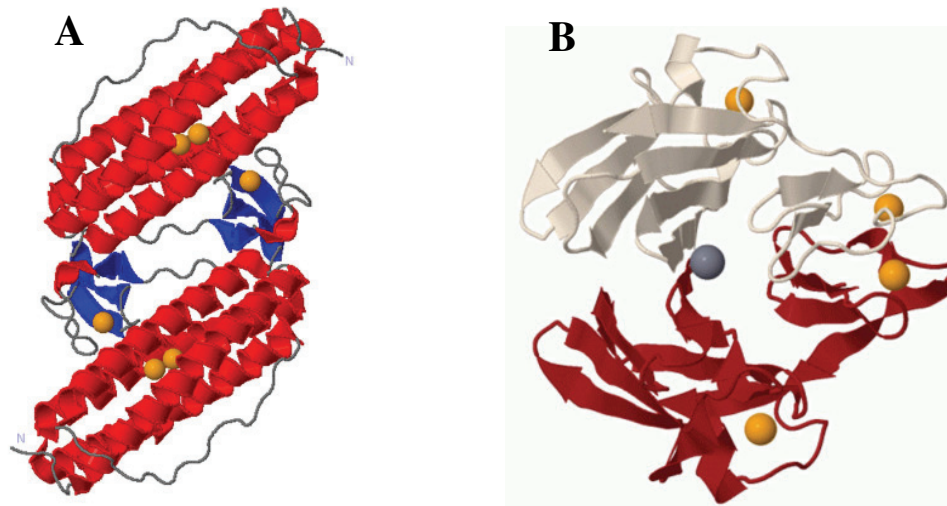
Der Aufreinigungserfolg konnte (mit Ausnahme des farblosen Dfx) schon durch die jeweilige charakteristische Färbung der *Strep*-Tactin-Säule abgeschätzt werden (vgl. 3.2.2).

Da die *C. acetobutylicum* Überexpressionsstämme (mit Ausnahme von pTrevrbr3B) keine deutlich induzierte Bande im 1D-Gel aufwiesen, wurde zum Nachweis der Proteinexpression auf den Western-Blot zurückgegriffen. Dadurch konnte die Bildung von Dfx, revRbr und NROR bei der für die späteren Experimente zur Charakterisierung der Stämme verwendeten OD<sub>600</sub> von 1,0 nachgewiesen werden (s. 3.2.6, Abb. R10).

Eine Größenbestimmung der gereinigten nativen Proteine ergab für das in dieser Arbeit verwendete normale Rbr RubY mit einer Größe des Hauptelutionspeaks von 53,5 – 56 kDa ein Vorkommen als Dimer. Dies wurde bereits für Rbrs anderer Organismen beschrieben (LeGall *et al.*, 1988; Jin *et al.*, 2002). Zudem kam in geringerem Maße auch eine tetramere Form vor. Die dimere Form in Abb. D1A zeigt zudem die mögliche Interaktion der Rd-ähnlichen Domäne mit der Ferritin-ähnlichen Domäne der anderen Untereinheit, wie sie für *D. vulgaris* Rbr beschrieben wurde (Jin *et al.*, 2002).

Die NROR war, wie auch in Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, nur als Monomer vertreten (Guedon und Petitdemange, 2001).

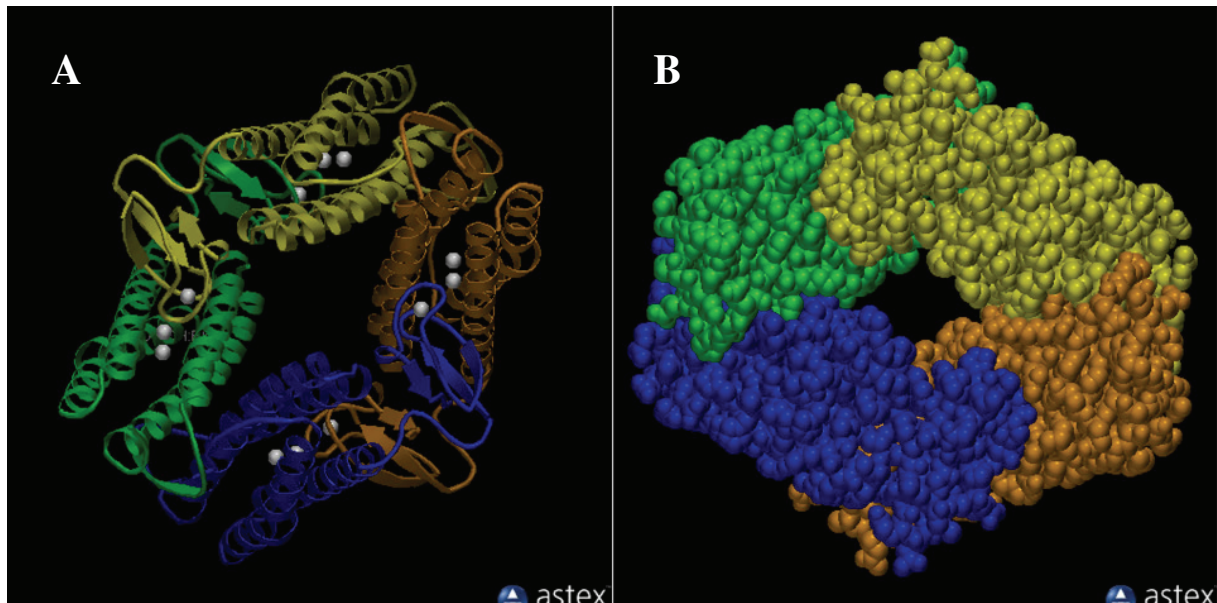
Dfx schien hingegen zur Bildung multimerer Strukturen zu neigen. Für Dfx aus anderen Organismen wurde die biologisch aktive Form als Homodimer beschrieben (Coelho *et al.*, 1996; Abb. D1B), einige SORs bilden jedoch auch Tetramere (Yeh *et al.*, 2000). Bisher sind keine Hinweise auf höherzahlige Multimere von Dfx in der Literatur bekannt.



**Abb. D1: Dimerstrukturen von Rubrerythrin und Desulfoferrodoxin**

**A** Dargestellt ist die 3D-Struktur von Rubrerythrin aus *D. vulgaris* Hildenborough ATCC 29579 mit Hilfe des Programms „Jmol Viewer“. Koordinaten PDB 1LKO nach Jin *et al.*, 2002. Orange Kugel, Eisen-(III)-Ligand; rot, N-terminale Ferritin-ähnliche Domäne; blau, C-terminale Rubredoxin-ähnliche [Fe(SCys)<sub>4</sub>]-Domäne; **B** Dargestellt ist die 3D-Struktur von Desulfoferrodoxin aus *D. desulfuricans* ATCC 27774 mit Hilfe des Programms „Jmol Viewer“. Koordinaten PDB 1DFX nach Coelho *et al.*, 1996. Orange Kugel, Eisen-(III)-Ligand; dunkelgraue Kugel, Kalzium-Ligand; rot, [Fe(NHis)<sub>4</sub>(SCys)]-Domäne; hellgrau, [Fe(SCys)<sub>4</sub>]-Domäne.

Das Elutionsprofil von revRbr wies nur einen stabilen Peak auf, welcher im Bereich von 112 – 127 kDa auftrat und somit wesentlich größer war als für ein Dimer zu erwarten gewesen wäre (ca. 46 kDa). Demnach lag das revRbr als Tetramer vor. Vermutlich kommt es in dieser Form zur Bildung einer Ringstruktur ähnlich der in Abb. D2. Die dort gezeigte Tetramerstruktur trat jedoch nie in Lösung auf und konnte bisher nur bei einer Kristallisation von *D. vulgaris* Rbr beobachtet werden (Donald Kurtz, Universität San Antonio, Texas, USA; pers. Kommunikation). Dies würde zudem aufgrund des höheren Volumens des Proteins zu einer erhöhten Elutionsgeschwindigkeit führen, was erklären würde, warum hier nicht 92 kDa, sondern ein höheres Molekulargewicht ermittelt wurde.



**Abb. D2: Kristallstruktur von *D. vulgaris* Rbr als Tetramer**

Die Struktur wurde mit Hilfe des Programms AstexViewer™ von Astex Therapeutics Ltd (<http://www.astex-therapeutics.com/home.php>) dargestellt. Gezeigt ist die Bildung einer Ringstruktur der tetrameren Form von *D. vulgaris* Rbr (nach DeMare *et al.*, 1996).

**A** Eisenatome sind als graue Sphären, die Sekundärstruktur der Untereinheiten als Helices und Pfeile dargestellt; **B** Tertiärstrukturen der 4 Untereinheiten sind als Sphären (entsprechend den Aminosäuren) und zusätzlich verschiedenfarbig dargestellt.

Eine tetramere Form konnte im Labor von Donald Kurtz (Universität San Antonio, Texas, USA) bestätigt werden. RevRbr von *C. acetobutylicum* ist somit das erste Rubrerythrin, das in Lösung eine stabile Tetramerstruktur bildet. Rbrs anderer Organismen liegen sowohl als biologisch aktive Form in Lösung, als auch als Kristallstruktur in homodimerer Form vor (Sieker *et al.*, 1999; Center for structural genomics (JCSG), 2004). Inwiefern dieser Unterschied auf die reverse Domänenstruktur zurückgeführt werden kann und was die daraus resultierenden Auswirkungen auf die Proteinfunktion (z. B. durch veränderte intra- oder intermolekulare Elektronenübertragung oder andere Zugänglichkeit der Reaktionszentren für die Substrate) ist, konnte bisher nicht untersucht werden. Aufschluss darüber könnten röntgenkristallographische Untersuchungen geben. Versuche einer Kristallisation des revRbr schlugen jedoch bisher fehl. Eine genaue Tertiärstruktur der reversen Rbrs ist daher bisher nicht bekannt (Donald Kurtz, Universität San Antonio, Texas, USA; persönliche Kommunikation). Für einige Proteine mit schwieriger Kristallisation waren Kokristallisationen mit anderen Proteinen erfolgreicher als Einzelkristallisationen. So wäre es für revRbr z. B. interessant eine Kristallisation zusammen mit NROR oder Rd zu versuchen. Es konnte bereits eine Rubredoxin Reduktase (RubR) im Komplex mit Rubredoxin (Rd, beide

aus *Pseudomonas aeruginosa*) kristallisiert werden, wobei das RubR hohe Ähnlichkeiten zur NROR aus *C. acetobutylicum* aufweist und auch die gleiche katalytische Reaktion (Reduktion von Rd) durchführt (Hagelueken *et al.*, 2007). Um eine solche Kokristallisation durchführen zu können, sollten allerdings zunächst die Bindungskonstanten eines möglichen NROR/Rd- oder NROR/revRbr-Komplexes gemessen werden (Donald Kurtz, Universität San Antonio, Texas, USA; persönliche Kommunikation). Ein Hinweis auf einen solchen Komplex (NROR/revRbr) ergab sich während dieser Arbeit. Die unter 3.2.4 durchgeführten Experimente deuten auf eine direkte Interaktion von NROR und revRbr hin. Für diese Interaktionsstudie wurde zunächst NROR aus einer *E. coli* Überexpression an eine Strep-Tactin-Sepharose-Affinitätsmatrix gebunden. Anschließend wurden die nicht gebundenen *E. coli* Proteine von der Säule gewaschen. Bei anschließender Zugabe von *C. acetobutylicum* Wildtyp Proteinextrakt konnte nach der Elution der Proteine (ohne nochmaliges Waschen) zusätzlich zu der an die Säule gebundenen NROR die eindeutige Anreicherung eines ca. 20 kDa großen Proteins im 1D-Gel gezeigt werden. Dies konnte als revRbr mittels Massenspektrometrie identifiziert werden. Auch aufgrund der in *in vitro* Funktionstests nachgewiesenen direkten Elektronenübertagung von NROR auf revRbr scheint hier eine zufällige Anreicherung unwahrscheinlich und deutet in diesem Fall auf die Bildung eines hochmolekularen Proteinkomplexes zur Abwehr von oxidativem Stress hin.

In den FPLC-Analysen konnte hingegen keine Erhöhung der Molekulargewichte durch Zugabe anderer Proteinkomponenten (Rd, NROR oder Rd/NROR) gezeigt werden. Unter den gewählten Bedingungen entsprachen die Elutionspeaks denen der Untersuchungen der jeweiligen Einzelproteinfraktionen. Ein Zusammenwirken der Proteine und somit die Bildung eines möglichen „Deoxysoms“ konnte mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden.

## **4.2 Proteinfunktionen**

Die Ergebnisse zur funktionellen Charakterisierung von Proteinen, welche potenziell an der Entgiftung von Sauerstoff und seinen Radikalen in *C. acetobutylicum* beteiligt sind, werden auf den folgenden Seiten diskutiert.

### **4.2.1 Funktionen von Desulfoferrodoxin**

Basierend auf den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen kann auf eine Funktion des *C. acetobutylicum* Dfx (*cac2450*) als Superoxid-Reduktase geschlossen werden. Die Verwendung von Dfx stellt für *C. acetobutylicum* als obligaten Anaerobier einen effizienten Abwehrmechanismus gegen oxidativen Stress, im speziellen gegen Superoxid dar. Ein Funktionsnachweis der im Genom annotierten Superoxid-Dismutasen konnte hingegen bisher



nicht erbracht werden. Northern-Blot Analysen zum Expressionsprofil von Dfx zeigten erhöhte Transkriptmengen von *cac2450* in *C. acetobutylicum* nach Sauerstoffexposition (Kawasaki *et al.*, 2005). In vorhergehenden Arbeiten konnte zudem eine nahezu 2fache Zunahme des Dfx-Proteinlevels nach Sauerstoffstress gezeigt werden (Riebe, 2005). Diese Induktion wird vermutlich durch die Inaktivierung des für die Regulation des oxidativen Stressoperons (*cac2448* – *cac2450*), in dem auch Dfx enthalten ist, verantwortlichen Repressors PerR durch Sauerstoffradikale verursacht (Hillmann *et al.*, 2008).

Die Superoxid-Reduktase Aktivität stellt den ersten Teil eines zum SOD/Katalase System alternativen Reaktionsweges zur Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in anaeroben Bakterien dar (Jenney *et al.*, 1999; Weinberg *et al.*, 2004; Grunden *et al.*, 2005). In dem hier verwendeten *in vitro* Funktionstest konnte ein NADH-Umsatz nur beobachtet werden, wenn neben Dfx auch Rd und NROR im Reaktionsansatz vorhanden waren. Bei Abwesenheit von Dfx konnte kein NADH-Verbrauch gemessen werden. Das gleiche Bild zeigte sich bei Verwendung von NADPH und FNR anstatt NADH und NROR. Auch hier waren Dfx und Rd essenziell für die Reaktion (vgl. 3.3.2.2). Zudem zeigte eine Hemmung des NAD(P)H-Konsums nach Zugabe einer SOD, dass  $O_2^-$  als Substrat diente und Dfx mit der SOD um das Superoxid konkurriert.

Die Ergebnisse deuten somit auf eine Elektronenübertragung vom NAD(P)H über FNR bzw. NROR weiter zu Rd und von dort über Dfx auf Superoxid hin. Zusätzlich konnte eindeutig  $H_2O_2$  als Reaktionsprodukt bestimmt werden (vgl. 3.3.2.2.2).

Superoxid-Reduktasen können, je nach Domänenstruktur, in 2 Unterklassen eingeteilt werden. Die 2Fe-SOR Untergruppe besitzt ein  $[Fe(SCys)_4]$ - und ein  $[Fe(NHis)_4(SCys)]$ -Zentrum, wobei die Funktion des ersteren Zentrums noch nicht geklärt werden konnte.

Die in der 1Fe-SOR Untergruppe zusammengefassten Proteine besitzen kein  $[Fe(SCys)_4]$ -Zentrum (Emerson *et al.*, 2003). Funktionell zeigen sich keine Unterschiede zwischen 2Fe- und 1Fe-SORs. Das Spektrum der 2Fe-SORs zeigt durch das vorhandene  $[Fe(SCys)_4]$ -Zentrum im Gegensatz zu den 1Fe-SORs eine Absorption auch über 400 nm.

Da zusätzlich zu dem Fehlen von Absorptionsmerkmalen oberhalb von 400 nm auch die Sequenzdaten darauf hindeuten, dass kein  $[Fe(SCys)_4]$ -Zentrum vorhanden ist, kann *C. acetobutylicum* Dfx zu den 1Fe-SORs gezählt werden. Das Spektrum ähnelt dem einer veränderten 2Fe-Form aus *D. vulgaris*, bei dem für die Bildung des  $[Fe(SCys)_4]$ -Zentrums wichtige Cysteine mutiert wurden und zeigt eine für 1Fe-SORs charakteristische Schulter bei 330 nm.

Die nachgewiesene Funktion von Dfx aus *C. acetobutylicum* bestätigt, dass allein das [Fe(NHis)<sub>4</sub>(SCys)]-Zentrum essenziell ist, um die Reaktion von Superoxid zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu katalysieren. Zuvor konnte die Funktionalität von SORs mit nur einem Eisenzentrum neben der oben genannten veränderten 2Fe-SOR von *D. vulgaris* nur für Dfx von *Treponema pallidum* (1Fe-SOR) und Neelaredoxin von *D. gigas* gezeigt werden (Lombard *et al.*, 2000b; Emerson *et al.*, 2003).

Genau wie auch Dfx von *T. pallidum* enthält Dfx von *C. acetobutylicum* eine N-terminale Domäne mit Sequenzähnlichkeit zur [Fe(SCys)<sub>4</sub>]-Domäne von 2Fe-SORs. Bei beiden Proteinen fehlen aber 3 der für die Bildung des [Fe(SCys)<sub>4</sub>]-Zentrums notwendigen 4 Cysteine (Abb. D3).

Zentrum I [FeS(Cys) <sub>4</sub> ]	
D.vulgaris	-----MPNQYEIVKC-IHCGNIVEVLHAGGDLVCCGPEPMKLMKEGTS 43
D.desulfuricans	-----PKHLEVYKC-THCGNIVEVLHGGGAEIVCCGPEPMKHMVEGST 42
D.barsii	-----MPERLQVYKC-EVCGNIVEVLNGGIGELVCCNQDMKLMSENTVD 43
M.thermoautotrophicum	-----MTETNQIFRC-NVCGNIVEVLNPGAGQLVCCNQPMELLVARRTD 43
C.tetani	MLIFMNRDNFMRGDLINTELLQVYKC-QVCGNIVEVVKGGGQLVCCNQPMKLFVENTVD 59
C.botulinum	-----MVKLNEVYKC-EVCGNMVQVHASAGQLVCCGKPMRLLEENTD 43
C.beijerinckii	-----MTLEKQVYKC-EICGNIVEVVMHAGGTLVCCNQPMKLAENTTD 43
C.butyrlicum	-----MAKIKDVYKC-DVCGIIVEVTHGGGTLSCCGKPMRLIVENTVD 43
C.difficile	-----MCSEQKFFIC-ETCGNLVGMISGGVPIFCGKPMKELVVENTD 43
T.pallidum	-----MGRELSFFLQKESAGFFLGMDAPAGSSVACGSEVLRAPVPGTVD 44
C.acetobutylicum	-----MNNDLSIYVS-KNSGTAVLLQNGTDLTCGSEPMKIVANTTD 43
	..: .*: : : : * : : *
Zentrum II [Fe(NHis) <sub>4</sub> (SCys)]	
D.vulgaris	GAKEKHVPVIEKTANGYKVTGVSVAHPMEEKHWIEWIELVADGVSYYKFLKPGDAPEAEF 103
D.desulfuricans	GAMEKHVPVIEKVDGGYLKVGSPHPMEEKHWIEWIELLADGRSYTKFLKPGDAPEAFF 102
D.barsii	AAKEKHVPVIEKIDGGYKVKVGAHAPMEEKHYIQWIELLADDKCYTQFLKPGQAPAEAF 103
M.thermoautotrophicum	VGPEKHVPVVEETGTGIRVKVGEVPHPMEEHHIQWIEVIAGDMVYRKDLNPGDNPEAEF 103
C.tetani	AAVEKHVPVIEKIEGGIRVKIGEAHPMIEEHYIEWIEVLTKVYRKHLKPGKPAEF 119
C.botulinum	AALEKHVPVVEKIENGVKVKEKEHPMEEKHYIEWIEVITENKVYKYLKPGKPEAEF 103
C.beijerinckii	GATEKHVPVIEKVEGGVLKVGSEHPMLDNHYIEWIEHTESNVYKFLKPGKPEAEF 103
C.butyrlicum	AAVEKHIPAVEKNGDEIIIVKVGSEHPMTEQHYIEWIEVNTENKVYRKFLTPEDKPEAEF 103
C.difficile	AAVEKHVPVIEVDGMNVTVKVSTTHPMTEKHIAVYLMTEQGGQRKCLAVDGEPPVKF 103
T.pallidum	AAKEKHIPVVEVHGHEVKVKVGAHPMTPEHYIAVCLKTRKGIQLKELPVDGAPVET 104
C.acetobutylicum	AAQEKHVPVHITKNGNMIDVSVGSEHPMTPEHFIEWIILVSGDRLEMAKLTMDMKPRAQF 103
	. ***: * : : : : : : : : : * * . *
Zentrum II	
D.vulgaris	CIK--ADKVAREYCNLHGHMKAEA- 126
D.desulfuricans	ATD--ASKVTAREYCNLHGHMKAEN- 125
D.barsii	LIE--AAKVAREYCNLHGHMKAEN- 126
M.thermoautotrophicum	PVEM-ASDFMVRICYNIHGLWY--- 124
C.tetani	KLD--EEVVAAREYCNLHGLWKK--- 140
C.botulinum	KLD--EEVVKVRGYCNLHGLWKK--- 124
C.beijerinckii	KVD--EPVLFAREYCNLHGLWAEKNS 127
C.butyrlicum	KIA--EEVISAKAYCNLHGLWTANL- 126
C.difficile	ALMDDKVISAYAYCNLHGLWKAEL- 128
T.pallidum	ALTADDQVLEAYFCNLHGVUSGK-- 128
C.acetobutylicum	HNVTSG---TVYAYCNLHSLWKADI- 125
	. :*: : . *

**Abb. D3: Sequenzvergleich von Dfx verschiedener Organismen**

Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen von Desulfoferrodoxinen aus *Desulfovibrio* (D.), *Methanoanaerobacterium* (M.), *Clostridium* (C.) und *Treponema* (T.) Stämmen. Die Alignments wurden mit Hilfe der Software ClustalW erstellt (Larkin *et al.*, 2007). Konservierte AS sind durch einen Stern (\*), AS mit ähnlichen biochemischen Eigenschaften sind durch Punkte (.) oder (:), eingefügte Lücken durch (-) gekennzeichnet. Schattierte Aminosäuren sind beteiligt an der Bildung der beiden mononuklearen Eisenzentren (Lombard *et al.*, 2000b).

In einem Datenbankvergleich von Desulfoferrodoxinen konnte bis auf das *T. pallidum* Dfx kein weiteres Protein mit nur einem funktionellen Zentrum identifiziert werden. Bisher ist eine Funktion dieser rudimentären Domäne in den 1Fe-SORs ebenso wie die Funktion des [Fe(SCys)<sub>4</sub>]-Zentrums als solches in 2Fe-SORs ungeklärt. Eine 2Fe-SOR aus *D. vulgaris* war auch ohne diese Domäne als SOR aktiv (Emerson *et al.*, 2003). Der NAD(P)H-Verbrauch der Reaktion in *C. acetobutylicum* (5,75  $\mu\text{M}$  NAD(P)H pro  $\mu\text{mol}$  Rd pro min bei Überschuss von Dfx und 4,65  $\mu\text{M}$  NAD(P)H pro  $\mu\text{mol}$  Dfx pro min bei Überschuss von Rd) in dem in dieser Arbeit verwendeten SOR-Aktivitätstest betrug allerdings nur ca. 1/3 des *D. vulgaris* Dfx (12,5  $\mu\text{M}$  NADPH  $\text{min}^{-1}$  [Emerson *et al.*, 2003]). Die Ursache könnte darin begründet sein, dass *D. vulgaris* anders als *C. acetobutylicum* in einer Umgebung mit geringen Sauerstoffkonzentrationen (mikroaerophil) leben kann und somit auch über längere Zeit mit höheren ROS-Konzentrationen in Kontakt kommt (O'Brien und Morris, 1971; Morris und O'Brien, 1971; Johnson *et al.*, 1997). Somit wurden die Dfx vermutlich hin zu einer höheren Aktivität selektiert. Andersherum könnte aber auch das Überleben dieses Bakteriums unter mikroaerophilen Bedingungen durch allgemein höhere Aktivitäten seiner ROS-Entgiftungsmaschinerie begründet sein. Dies bestätigt die Vermutung, dass die Aktivitäten der ROS-Entgiftungsreaktionen einen wichtigen Beitrag zur Überlebensfähigkeit anaerober Bakterien nach Sauerstoffexposition oder an aeroben/anaeroben Grenzflächen beitragen. Trotz der Eingruppierung von *D. vulgaris* in die obligaten Anaerobier zeigte dieses Bakterium in einem Medium mit Sauerstoffgradienten ein zielgerichtetes Schwimmen hin zu einem Bereich mit einer Sauerstoffkonzentration von 0,02 – 0,04 % (entsprechend 0,24 - 0,48  $\mu\text{M}$ ) und zeigte dort auch ein verstärktes Wachstum. Es wurde spekuliert, dass *D. vulgaris* anaerobe Umweltbereiche dadurch vor dem Eindringen von Sauerstoff schützen kann (Johnson *et al.*, 1997). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit durch eine mögliche Regeneration von Sulfat durch eine Sauerstoffoxidation von Sulfid während der Sulfatreduktion von Vorteil sein kann (Widdel und Hansen, 1992). Einige Sulfatreduzierer können Sauerstoff sogar direkt als Elektronenakzeptor nutzen (mit H<sub>2</sub> als Elektronendonator), wobei eine erhebliche Menge ATP gebildet wird (Dannenberg *et al.*, 1992; Cypionka, 2000; Dilling und Cypionka, 1990).

Für Dfx konnte neben der nachgewiesenen SOR-Aktivität eine geringe SOD-Aktivität in Zymogrammen (ohne Mitwirkung anderer Proteine) gezeigt werden (s. 3.3.1). Diese scheint jedoch im Vergleich zu *E. coli* SOD zu gering um für *C. acetobutylicum* *in vivo* relevant zu sein. Eine Funktion der im Genom von *C. acetobutylicum* annotierten SODs (Nölling *et al.*,

2001) konnte bisher nicht gezeigt werden. Diese scheinen somit trotz nachgewiesener Expression infolge von oxidativem Stress (Kawasaki *et al.*, 2005) nicht funktionell zu sein.

*C. acetobutylicum* entgiftet anfallendes Superoxid offensichtlich bevorzugt durch Reduktion unter Verbrauch von Reduktionsäquivalenten wie NAD(P)H anstatt durch Disproportionierung. Diese Entgiftungsreaktion stellt eine einfache Methode dar, den NADH-Umsatz der Zelle zu erhöhen. Andernfalls müssen bei Anaerobiern die Reduktionsäquivalente aufwendig entsorgt werden. Es ergibt sich also bei Verwendung dieses Detoxifikationsweges zusätzlich zur Vermeidung des freiwerdenden Sauerstoffs durch eine SOD/Katalase Reaktion ein weiterer positiver Effekt. Dies könnte auch das verbesserte Wachstum der *C. acetobutylicum* Überexpressionsstämme pTdfx und pTrevrbr3B unter geringfügigem oxidativem Stress im Vergleich zu ungestressten Zellen erklären (vgl. 3.6.4).

#### 4.2.2 Funktionen von revRbr

Untersuchungen zur Expression von revRbr infolge von oxidativem Stress, ausgelöst durch Luft oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, zeigten erhöhte Expressionsraten auf RNA-Ebene (Kawasaki *et al.*, 2004; May *et al.*, 2004). Dies konnte auch auf Proteinebene bestätigt werden (Riebe, 2005; Kawasaki *et al.*, 2004). Somit wurde eine Beteiligung von revRbr bei der oxidativen Stressabwehr vermutet.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen bestätigen diese Vermutung. Die *in vitro* und *in vivo* Experimente zur Funktion von revRbr lassen auf eine NAD(P)H-Oxidase und Peroxidase Aktivität schließen, wobei sowohl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als auch O<sub>2</sub> die endständigen Elektronenakzeptoren sein können (3.4.2).

*C. acetobutylicum* pTrevrbr3B wies eine stark erhöhte Toleranz gegenüber Luft und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf. Im Plattenversuch zeigte sich nach Luftbegasung für diesen Stamm sogar eine erhöhte Anzahl an Kolonien im Vergleich zur ungestressten Probe (3.6.4.1). Bei Applikation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konnte (korrelierend mit den Ergebnissen nach Luftbegasung) ebenfalls ein besseres Wachstum bei Einsatz niedrigmolarer Wasserstoffperoxidkonzentrationen für den revRbr-Überexpressionsstamm gezeigt werden (3.6.4.2). Dieser Effekt fiel bei Überexpression von Dfx in *C. acetobutylicum* pTdfx geringer aus, war jedoch ebenso vorhanden. Sämtliche *C. acetobutylicum* Defektmutanten und der Wildtyp zeigten dieses Phänomen nicht.

Für *C. acetobutylicum* pTrevrbr3B konnte in Übereinstimmung mit der Verwendung von sowohl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als auch O<sub>2</sub> in den *in vitro* Funktionstests für revRbr auch in den *in vivo* Experimenten ein etwa 2fach erhöhter Sauerstoffverbrauch im Vergleich zum Wildtyp gemessen werden (*C. acetobutylicum* pTrevrbr3B 2,49 fmol h<sup>-1</sup> Zelle<sup>-1</sup> > *C. acetobutylicum* Wt 1,29 fmol h<sup>-1</sup> Zelle<sup>-1</sup>). Obwohl sich in den *in vitro* Tests H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als das bevorzugte Substrat

für revRbr herausstellte (vgl. 3.4.2.3), konnte auch eine Reaktion von revRbr mit O<sub>2</sub> gezeigt bzw. *in vivo* ein erhöhter O<sub>2</sub>-Konsum von *C. acetobutylicum* pTrevrbr3B festgestellt werden. Diese Aktivität könnte dann in der Zelle relevant werden, wenn revRbr infolge von oxidativem Stress massiv induziert wird (gezeigt infolge von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress und Begasung mit Luft auf Transkriptlevel [May *et al.*, 2004] bzw. für Luft auf Proteinlevel [Kawasaki *et al.*, 2004; Riebe, 2005]) und der intrazelluläre O<sub>2</sub>-Gehalt höher als der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Level ist. Die Induktion der Transkription von *revrbr* nach oxidativem Stress konnte ebenfalls durch Microarray-Daten bestätigt werden (Hillmann, Universität Rostock, pers. Kommunikation). In dem Fall stellt auch die relativ hohe Grundexpression von revRbr für die Zelle eine Möglichkeit dar, schnell auf den auftretenden Stress zu reagieren und ungewünschte Oxidationen von anderen Zellkomponenten zu vermeiden. Eine Grundexpression ist daher auch unter anaeroben Bedingungen vorteilhaft.

Unter Sauerstoffstress konnte in vorangegangenen Arbeiten neben revRbr auch die Induktion eines Flavoproteins gezeigt werden (Riebe, 2005; Kawasaki *et al.*, 2004 und 2005). Eine der Hauptfunktionen solcher Flavoproteine ist neben der NO-Abwehr auch die O<sub>2</sub>-Entgiftung zu Wasser. Eine verstärkte Expression solcher Proteine (FprA1 und FprA2) konnte ebenfalls in einer Knockout Mutante von *C. acetobutylicum* bestätigt werden, bei welcher der oxidative Stressrepressor PerR ausgeschaltet wurde (Hillmann *et al.*, 2008). Flavoproteine von *C. acetobutylicum* zeigen ebenfalls eine starke Reaktion mit Sauerstoff und sind wahrscheinlich zum Großteil verantwortlich für die erhöhte Sauerstofftoleranz und Sauerstoffverbrauch des  $\Delta$ *perR*-Stammes (Hillmann *et al.*, 2008 und 2009). Auch bei der Entgiftung über diese Flavoproteine sind NROR und Rd essenzielle Elektronenüberträger.

Neben der NAD(P)H-Peroxidase und NAD(P)H-Oxidase Aktivität konnte auch eine Superoxid-Dismutase Aktivität von revRbr nachgewiesen werden (3.4.1). Eine in dem *perR*-Knockout sichtbare SOD-Aktivitätsbande in einem Zymogramm könnte dem revRbr zuzuschreiben sein (Hillmann *et al.*, 2008). Genau wie bei Dfx ist die SOD-Aktivität aber eher gering im Vergleich zur Hauptaktivität des Enzyms und somit wohl nicht die eigentliche Aufgabe des Proteins in der Zelle. Die Überprüfung einer möglichen Katalase Aktivität von revRbr fiel negativ aus.

Um die Aktivitäten von revRbr besser mit denen normaler Rbrs vergleichen zu können, wurden die gleichen Experimente mit RubY, einem der zwei Rbrs von *C. acetobutylicum* mit normaler Domänenstruktur durchgeführt. RubY zeigte *in vitro* eine vergleichbare NADH-Peroxidase Aktivität wie revRbr (vgl. 3.4.2.1 und 3.4.3; bzw. Tab. R3). Anscheinend kann H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auch durch RubY entgiftet werden. Da die bei der Aufreinigung des RubY beobachtete

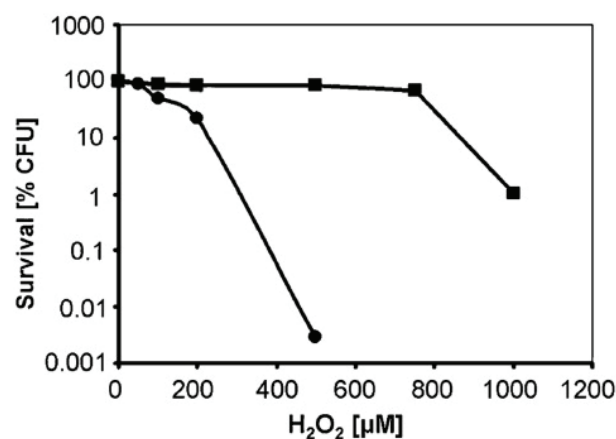
rote Färbung auch auf eine Funktionsfähigkeit des aktiven Eisenschwefelzentrums hindeutete und ursprünglich für normale Rbrs diese Funktion beschrieben wurde (Coulter *et al.*, 1999 und 2000; Coulter und Kurtz, 2001; Fournier *et al.*, 2003; Weinberg *et al.*, 2004; Kurtz, 2006), war dies nicht überraschend. Auch der Einfluss von Rd auf die Reaktion entsprach der bei revRbr. Ein erheblicher Unterschied zeigte sich jedoch im Reaktionsvermögen mit Sauerstoff. Dies lag bei RubY mit 3 % (ohne Rd) bzw. 14 % (mit Rd) der Peroxidase Aktivität im Bereich der Aktivität wie sie für andere Rbrs beschrieben wurde (Coulter *et al.*, 2000). Die Oxidase Aktivität von revRbr zeigte hingegen nicht 3 %, sondern 65 % der Peroxidase Aktivität, unabhängig vom Vorhandensein von Rd.

Im Gegensatz zu RubY konnte revRbr neben H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auch O<sub>2</sub> mit hoher Effektivität zu Wasser detoxifizieren. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stellte sich jedoch als bevorzugter Elektronenakzeptor heraus. Die Inhibierung des Sauerstoffverbrauchs in dem *in vitro* Test bei Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vor der Zugabe von revRbr deutet darauf hin, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stärker an das aktive Zentrum (Nicht-Schwefel-Eisen-Domäne) des revRbr bindet als O<sub>2</sub> (3.4.2.3, Abb. R20). Dieser Effekt ist nicht auf eine Inaktivierung der Enzyme zurückzuführen, da der gleiche Reaktionsansatz unter aeroben und anaeroben Bedingungen noch NADH-Verbrauch zeigte (3.4.2.1, Abb. R16 und R18). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit höherer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Reaktivität der Nicht-Schwefel-Eisen-Zentren anderer Rbrs (Coulter und Kurtz, 2001). Der Reaktionsmechanismus von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit dem 2Fe-Zentrum konnte bei anderen Rbrs bereits aufgeklärt werden (Kurtz, 2006). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zieht 2 Elektronen vom Eisenzentrum ab ( $2 \text{ Fe}^{2+} \rightarrow 2 \text{ Fe}^{3+}$ ), wodurch auch die Bildung von hochreaktiven OH•-Radikalen durch die an Fe<sup>2+</sup>-Ionen auftretende Fenton-Reaktion minimiert wird (Imlay, 2008). Im Kontrast dazu werden 4 Elektronen benötigt, um O<sub>2</sub> zu Wasser zu reduzieren. Diese werden zunächst durch externe Elektronendonoren (NROR, Rd) auf die [Fe(SCys)<sub>4</sub>]-Domäne derselben oder einer anderen Untereinheit des revRbr-Homotetramers übertragen und von dort dem reaktiven Nicht-Schwefel-Eisen-Zentrum zugeführt. Da somit nicht in einem Schritt diese 4-Elektronenreduktion durchgeführt werden kann, entsteht wahrscheinlich zunächst H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Zwischenprodukt, welches bedingt durch die hohe Affinität des Zentrums zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> offenbar im Zentrum verbleibt. Die Entstehung oder Freisetzung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> während der Reaktion konnte nicht beobachtet werden (3.4.2.2).

Ungewöhnlicherweise konnte keine Induktion eines normalen Rbrs in Northern-Blot Analysen in *C. acetobutylicum* (May *et al.*, 2004; Hillmann *et al.*, 2006) oder anderen Clostridien gezeigt werden (Geissmann *et al.*, 1999). Microarray-Daten zeigten ein sehr geringes Expressionslevel der normalen Rbrs und keine Beeinflussung der Expression durch Sauerstoffstress (Hillmann, Universität Rostock, persönliche Kommunikation). Rbrs von

sulfatreduzierenden Mikroorganismen (Lumppio *et al.*, 1997 und 2001; Dolla *et al.*, 2006) und Archaeobakterien (Weinberg *et al.*, 2004) zeigten hingegen eine starke Induktion. Warum Clostridien auf eine Induktion der normalen Rbrs verzichten und bevorzugt die reversen Rbrs verwenden, bleibt ungeklärt.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass revRbr zu der erhöhten oxidativen Stresstoleranz des  $\Delta perR$ -Stammes beiträgt (Hillmann *et al.*, 2008). Der Knockout des *rbr3AB*-Repressors PerR führte zu einer stark induzierten Expression von revRbr und FprA1 in 2D-Gelen, ähnlich den Beobachtungen bei sauerstoffgestressten Zellen des Wildtyps. Die Expression des revRbr in dem  $\Delta perR$ -Stamm ist so stark, dass Zellaufschlüsse die gleiche rote Färbung wie das gereinigte revRbr zeigen (vgl. 3.2.2). Zusätzlich konnten im Vergleich zum Wildtyp stark erhöhte NADH-Peroxidase/Oxidase Aktivitäten in *C. acetobutylicum*  $\Delta perR$  gemessen werden (Hillmann *et al.*, 2008). Die Überlebensrate nach  $H_2O_2$ -Stress ist vergleichbar mit der des in dieser Arbeit untersuchten revRbr-Überexpressionsstammes *C. acetobutylicum* pTrevrbr3B (vgl. Abb. D4 mit Abb. R31).



**Abb. D4:** Überleben des  $\Delta perR$ -Stammes unter  $H_2O_2$ -Stress (Hillmann *et al.*, 2008; mod.)

Dargestellt sind die Überlebensraten von *C. acetobutylicum*  $\Delta perR$  (Quadrate) und *C. acetobutylicum* Wildtyp (Kreise) nach 30minütiger Inkubation mit verschiedenen  $H_2O_2$ -Konzentrationen relativ zu einer ungestressten Probe derselben Kultur.

Die Fähigkeit Sauerstoff zu reduzieren bzw. zu überleben war allerdings bei dem  $\Delta perR$ -Stamm höher ( $16 \text{ fmol h}^{-1} \text{ Zelle}^{-1}$  für  $\Delta perR$  vs.  $2,39 \text{ fmol h}^{-1} \text{ Zelle}^{-1}$  für die revRbr-Überexpression). Daraus konnte auf einen Einfluss weiterer Proteine auf diese Faktoren in *C. acetobutylicum*  $\Delta perR$  geschlossen werden. Die hauptsächliche Entgiftungsreaktion von molekularem Sauerstoff in der Zelle stellt dabei wohl die NADH-abhängige Reaktion von Sauerstoff über  $NROR \rightarrow Rd \rightarrow FprA1/FprA2$  dar (Hillmann *et al.*, 2009).

Die bisher erfolglose Herstellung einer *C. acetobutylicum rbr3AB*-Doppelknockout Mutante und die auch unter anaeroben Bedingungen relativ starke Expression von revRbr deutet zudem darauf hin, dass dieses Protein evtl. auch in andere Prozesse der Zelle eingebunden sein könnte (Hillmann *et al.*, 2006). Das Gleiche könnte auch für NROR der Fall sein. Lombard *et al.* (2000b) vermuteten für die SOR-Teilreaktion unter anaeroben Bedingungen eine Einbindung von Proteinen aus der Elektronentransportkette der Entgiftungsreaktion in den zellulären Metabolismus.

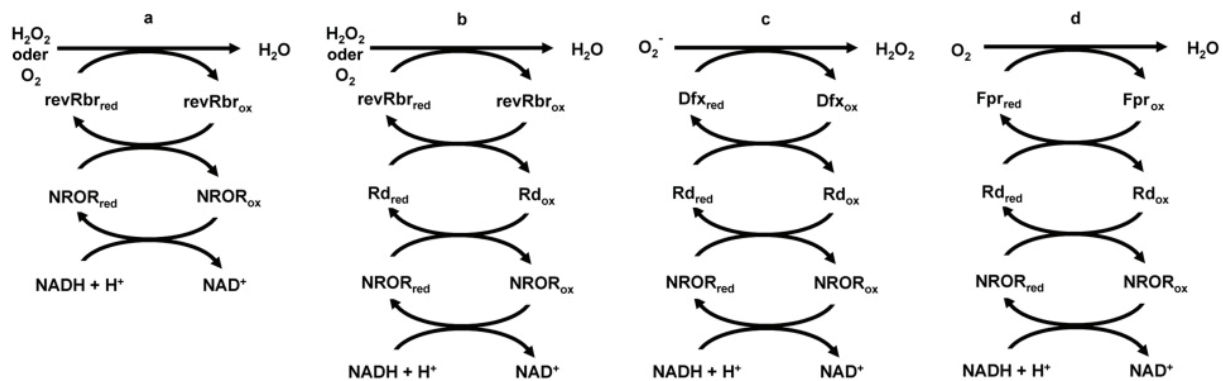
Hohe Expressionslevel von revRbr und multiple Kopien im Vergleich zu den anderen beteiligten Proteinen könnten evtl. auch Einfluss auf den Eisengehalt der Zelle haben. Dfx, NROR und Rd sind meist nur in einer Kopie in verschiedenen Clostridien zu finden, wohingegen mehrere normale und reverse Rbrs vorkommen (vgl. Tab. D1). Bei Vorhandensein von viel Rbr wird der Zelle zusätzlich lösliches Eisen-(II) entzogen und im Protein gebunden. Hier kann es stabil gehalten werden, solange genug Reduktionsäquivalente zur Verfügung stehen. Eine durch Eisensalze katalysierte Oxidation organischer Substrate mit Wasserstoffperoxid in saurem Millieu (Fenton-Reaktion; z. B. im Zytoplasma) wird somit verhindert. Diese Fenton-Reaktion ist neben den in der Einleitung schon beschriebenen Reaktionen eine Hauptquelle der Entstehung von ROS (Imlay und Fridovich, 1991). Dabei kommt es zur Bildung eines sehr reaktiven Eisen-(II)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Adduktes, welches weiter zu Fe-(III), OH• und OH<sup>-</sup> reagiert. Die Bildung dieser ROS würde durch ständige Regeneration des Fe-(II) im Reaktionszentrum von Rd, Rbr und revRbr minimiert. Die unter 3.6.2.2 (Tab. R5) aufgeführten Wachstumsdaten für int:*rbr3A* und int:*rbr3B* lassen allerdings nicht nur auf positive Effekte von revRbr schließen. Diese Defektmutanten zeigten unter anaeroben Bedingungen in Komplexmedium bessere Wachstumsraten als der *C. acetobutylicum* Wildtyp. Da der Expressionslevel der *revrbr*-Gene im Wildtyp auch in nicht-gestressten Zellen relativ hoch ist (Mikroarray-Daten von Falk Hillmann, pers. Kommunikation, Universität Rostock; Hillmann *et al.*, 2006), hat die Expression von revRbr in anaerober Umwelt offenbar nicht nur Vorteile für die Zelle und das Vorhalten von revRbr in ungestressten Zellen als Möglichkeit zur schnellen Stressabwehr stellt eventuell eine Belastung für die Zelle dar, wenn der Stress ausbleibt. Expressionsanalysen des Operons oder der Einzelgene in den beiden *C. acetobutylicum revrbr*-Defektmutanten wurden nicht durchgeführt.

#### 4.2.3 Elektronenübertragung

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass der angenommene Entgiftungsweg für ROS auch mit *C. acetobutylicum* Proteinen funktionell ist. Dabei nimmt Dfx die Rolle der SOR ein,



revRbr übernimmt eine Funktion als endständige Komponente einer NADH-Peroxidase/Oxidase Reaktion. Somit muss der von Weinberg (2004) für *P. furiosus* angenommene Reaktionsweg in *C. acetobutylicum* um die Oxidase Aktivität des revRbr erweitert werden. Zudem spielen weitere Proteine bei der Entgiftung von molekularem Sauerstoff eine Rolle. Dieser erweiterte Entgiftungsmechanismus für *C. acetobutylicum* ist in Abb. D5 dargestellt.



**Abb. D5: Entgiftungsreaktionen für ROS und  $O_2$  in *C. acetobutylicum***

**a** und **b** Reduktion von  $H_2O_2$  und  $O_2$  zu Wasser durch revRbr mit und ohne Rd; **c** Reduktion von Superoxid zu  $H_2O_2$  durch Dfx; **d** Reduktion von  $O_2$  durch Flavoproteine (FprA1/A2) zu Wasser (Hillmann *et al.*, 2009). Rd, Rubredoxin; revRbr, reverses Rubrerythrin; Dfx, Desulfoferrodoxin; Fpr, Flavoprotein; NROR, NADH:Rubredoxin Oxidoreduktase.

Alle Entgiftungsreaktionen (mit Ausnahme der revRbr-vermittelten Reaktion) sind abhängig von Rd als Elektronenüberträger. Da NROR wiederum dieses Rd reduziert, sind die Reaktionen auch von diesem Protein abhängig. Da NROR in den Energiestoffwechsel der Zelle eingebunden ist, stellt die Bildung dieses Proteins evtl. noch zusätzlich eine Belastung für die Zelle dar. Darauf deutet das langsame Wachstum des NROR-Überexpressionsstammes *C. acetobutylicum* pTnr in Minimalmedium hin (Tab. R5). Da es mehrere Elektronenakzeptoren für NROR gibt (revRbr, Rd und evtl. noch weitere Redoxproteine), scheint die Einbindung von NROR in weitere Elektronentransportwege, die nicht mit oxidativem Stress in Verbindung stehen, logisch. In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von NROR toxisch wirken kann (Grunden *et al.*, 2005). Ob umgekehrt *in vivo* eine weitere Möglichkeit besteht Rd zu reduzieren (durch andere Proteine als NROR) oder ob weitere Elektronenüberträger die Rolle des Rd übernehmen können (denkbar wären beispielsweise Thioredoxin oder Flavodoxin), konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Dagegen spricht der im Vergleich zu anderen *C. acetobutylicum* Mutanten starke Phänotyp der *rd*-Defektmutante *int:rd* unter oxidativem Stress (s. Abb. R30, 3.6.4).

Die Detoxifikation von ROS durch revRbr war als einzige nicht komplett von Rd abhängig. Hier konnte auch eine direkte Elektronenübertragung durch NROR erfolgen. Darauf deutete eine Redoxtitration des revRbr (s. Abb. R17, 3.4.2.1) sowie der NADH-Verbrauch hin, welche beide auch ohne Rd zu beobachten waren. Dies war allerdings auch für das normale Rbr RubY der Fall.

Wahrscheinlich reduziert NROR das [Fe(SCys)<sub>4</sub>]-Zentrum des revRbr, welches anschließend die so erhaltenen Elektronen auf das Nicht-Schwefel-Eisen-Zentrum derselben oder einer anderen Untereinheit des Tetramers überträgt (Jin *et al.*, 2004b, Lyer *et al.*, 2005). NROR kann ebenso das [Fe(SCys)<sub>4</sub>]-Zentrum von Rd reduzieren (Guedon und Petitdemange, 2001), welches wiederum die Elektronen auf das Nicht-Schwefel-Eisen-Zentrum von revRbr übertragen kann. Ob der Reaktionsmechanismus aufgrund der vertauschten Domänen bei revRbr anders ist als bei den Rbrs anderer Prokaryoten, kann hier nicht abschließend geklärt werden. Zur Aufklärung dieses Mechanismus wären Untersuchungen einer um die Rubredoxin-Domäne verkürzten Version des revRbr hilfreich. Für einen sehr ähnlichen Ablauf spricht, dass bei Verwendung von FNR anstelle von NROR der NADPH-Umsatz durch revRbr von der Anwesenheit von Rd abhängig war. Dies wurde so auch für normales Rbr von *D. vulgaris* (Coulter und Kurtz, 2001) und Dfx aus *C. acetobutylicum* (3.3.2.2) beschrieben.

Die *in vitro* Experimente zeigten unter Einsatz verschiedener Enzymkonzentrationen unterschiedliche Aktivitäten (3.3.2.2 [SOR] und 3.4.2 [revRbr]). Die SOR- sowie die NAD(P)H-Peroxidase und NAD(P)H-Oxidase Aktivitäten sind somit wahrscheinlich auch *in vivo* wesentlich durch die Konzentrationen der Reduktionsäquivalente und der Proteine NROR, Rd und Dfx bzw. revRbr beeinflusst. Zusätzliche Reaktionspartner können allerdings im *in vivo* System nicht ausgeschlossen werden, so ist z. B. eine Beteiligung weiterer Oxidoreduktasen oder die Verwendung zusätzlicher elektronenübertragender Proteine (z. B. Thioredoxin oder Flavodoxin) denkbar. Dadurch würde das Reduktionspotenzial der Zelle durch Verknüpfung unterschiedlicher Elektronentransportwege besser nutzbar sein.

Unter oxidativen Stressbedingungen könnten die Entgiftungsreaktionen nach Induktion der Proteinexpression (von revRbr, NROR, Dfx und Flavoproteinen) durch den intrazellulären NAD(P)H-Level, unter anaeroben Bedingungen hingegen bei ausreichendem Vorhandensein von Reduktionsäquivalenten durch die Proteinkonzentrationen begrenzt sein.

### 4.3            **Stresstoleranz verschiedener *C. acetobutylicum* Stämme**

Die Manipulation der Proteinkonzentration verschiedener an der Abwehr von oxidativem Stress beteiligter Proteine durch Ausschalten oder Überexpression der entsprechenden Gene (*rd*, *dfx*, *nrer*, *rubY*, *rbr3AB*) führte zu veränderten Toleranzen einiger *C. acetobutylicum* Stämme gegenüber oxidativen Stressoren. Die diesbezüglich erzielten Ergebnisse werden in den folgenden Unterpunkten diskutiert.

#### 4.3.1        **Verteidigung gegen oxidativen Stress**

Die Verteidigung von *C. acetobutylicum* gegen oxidativen Stress kann auf ein komplexes Netzwerk enzymatischer Reaktionen zurückgeführt werden, an dem eine Vielzahl von Proteinen beteiligt ist.

Auch für andere Clostridien sind solche Entgiftungsreaktionen zu vermuten. Um über die Verbreitung innerhalb der Clostridien Aufschluss zu erhalten, wurden Datenbankabgleiche der *C. acetobutylicum* Proteinsequenzen von Rd, Dfx, NROR und den Rubrerythrinen mit verschiedenen sequenzierten Clostridiengenomen vorgenommen (Tab. D1).

Mit Ausnahme von *C. thermocellum* wurden so in allen untersuchten Genomen entsprechende, für diese Proteine kodierende Sequenzen, identifiziert. In *C. thermocellum* konnten keine Gene für Dfx oder reverse Rubrerythrine identifiziert werden.

In den weiteren Clostridiengenomen zeigte sich neben dem Vorhandensein von mehreren Kopien von Rbrs (sowohl normale als auch reverse) auch das Auftreten von Fusionsproteinen mit zusätzlichen Rubredoxin Domänen. Proteine mit einer Rd-Domäne stellen potenzielle Interaktionspartner von Rubrerythrinen und NRORs dar und bieten vermutlich die Möglichkeit zur Vernetzung unterschiedlicher Reaktionswege. Durch Datenbankabgleiche der *C. acetobutylicum* Rd-Proteinsequenz konnten in *C. acetobutylicum* 5, in *C. difficile* 9, in *C. perfringens* 8, in *C. tetani* 6 und in *C. thermocellum* 5 Proteine identifiziert werden, welche Rd-Domänen enthalten.

**Tab D1: Verbreitung der zur Detoxifikation von ROS benötigten Gene bei Clostridien**

Organismus	Rd	Dfx	NROR	normales Rbr	reverses Rbr <sup>6</sup>
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	<i>cac2778</i>	<i>cac2450</i>	<i>cac2448</i>	<i>cac2575</i> <i>cac3018</i> (zu <i>cac2575</i> : I30, P47, G3)	<i>cac3597</i> <i>cac3598</i> (I99, P100, G0)
<i>C. difficile</i> 630	<i>cd0828</i> (I36, P57, G16)	<i>cd0827</i> (I40, P57, G2)	<i>cd1623</i> <sup>1</sup> (I28, P50, G4)	<i>cd2845</i> (zu <i>cac3018</i> : I30, P47, G9; zu <i>cac2575</i> : I48, P64, G1) <i>cd0825</i> (zu <i>cac3018</i> : I26, P42, G8; zu <i>cac2575</i> : I50, P67, G8)	<i>cd1524</i> (I77, P86, G0) <i>cd1474</i> (I76, P86, G0)
<i>C. perfringens</i> ATCC 13124	<i>cpe0777</i> (I67, P75, G0) <i>cpe0780</i> (I77, P84, G0)	-	<i>cpf1269</i> <sup>3</sup> (I30, P51, G8)	<i>cpe0135</i> (zu <i>cac3018</i> : I28, P43, G5; zu <i>cac2575</i> : I67, P78, G1) <i>cpe1331</i> (zu <i>cac3018</i> : I27, P43, G11; zu <i>cac2575</i> : I37, P56, G8) <i>cpe0855</i> (zu <i>cac3018</i> : I27, P45, G9; zu <i>cac2575</i> : I47, P66, G7)	<i>cpe0689</i> (I77, P88, G0) <i>cpe0082</i> (I79, P88, G0) <i>cpe2618</i> <sup>5</sup> (I79, P88, G0)
<i>C. tetani</i> E88	<i>ctc01387</i> <sup>2</sup> (I58, P70, G0)	<i>ctc02454</i> (I41, P54, G2)	<i>ctc02521</i> <sup>4</sup> (I30, P54, G4)	<i>ctc02638</i> (zu <i>cac3018</i> : I29, P43, G3; zu <i>cac2575</i> : I67, P80, G0) <i>ctc01182</i> (zu <i>cac3018</i> : I69, P85, G2; zu <i>cac2575</i> : I31, P48, G4)	<i>ctc00826</i> (I78, P85, G0)
<i>C. thermocellum</i> ATCC 27405	<i>cthe2164</i> (I78, P80, G0)	-	<i>cthe0200</i> (I29, P47, G6)	<i>cthe0860</i> (zu <i>cac3018</i> : I48, P45, G4; zu <i>cac2575</i> : I64, P74, G2), <i>cthe1771</i> (zu <i>cac3018</i> : I65, P82, G0; zu <i>cac2575</i> : I30, P47, G3)	-

Die Ähnlichkeiten der resultierenden Proteine wurden durch Alignment der Proteinsequenzen auf der Webseite [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov) mittels blastp blossomup62 in % bestimmt. I, gleiche Aminosäuren; P, ähnliche (inklusive gleiche Aminosäuren); G, Lücken.

**1** dieses Protein beinhaltet neben NROR auch die Domänen Rd und Flavodoxin; **2** Rubredoxin ist die C-terminale Domäne dieses Proteins; **3** C-terminale Domäne fusioniert mit Rd und Flavodoxin Domäne; **4** Rubredoxin ist C-terminal zusätzlich fusioniert; **5** Dieses Protein besitzt 2 N-terminale Rubredoxin Domänen; **6** revRbrs wurden aufgrund der Ähnlichkeit der beiden *C. acetobutylicum* revRbrs nur mit *cac3597* (*rbr3B*) abgeglichen.

Die in dieser Arbeit für *C. acetobutylicum* identifizierten endständigen, detoxifizierenden Enzyme sind sowohl in der Gruppe der Eisenschwefelproteine (Dfx, revRbr) als auch in der Gruppe der Flavoproteine (NROR, FprA1, FprA2) zu finden. Sauerstoff induziert die Transkription des oxidativen Stressoperons (*cac2448* – *cac2450*), welches die Gene *dfx*, *nror* und *fprA2* beinhaltet und das *revrbr*-Operon (*cac3597/98*) vermutlich durch Inaktivierung des oxidativen Stressrepressors PerR (Hillmann *et al.*, 2008). Ein ähnliches potenzielles oxidatives Stressoperon konnte bei den in Tab. D1 aufgeführten Clostridien für *C. difficile*

identifiziert werden (*cd0825* [*rbr*, Rubrerythrin], *cd0826* [*fur*, ferric uptake regulator], *cd0827* [*rbo*, Desulfoferrodoxin], *cd0828* [*rd*]). Weiterhin kann festgestellt werden, dass *C. acetobutylicum* durch das Vorhandensein der oben genannten Gene (*nrer*, *rd*, *dfx*, *rubY*, *rbr2*, *rbr3A/B*, *fprA1*, *fprA2*) sowie weiterer, potenziell bei der oxidativen Stressabwehr beteiligter, in dieser Arbeit aber nicht untersuchter Komponenten wie z. B. Thioredoxin (*cac0824*, *cac1547* [*trxA1*], *cac3083* [*trx A2*]), Thioredoxin Reduktase (*cac0869*, *cac1548* [*trxB1*], *cac3082* [*trxB2*]), Glutathion Peroxidase (*cac1549* [*bsaA*], *cac1570* [*bsaA*], *cac1571*), Glutaredoxin (*cac2777*), Superoxid-Dismutase (*cac1363* [*sodC*], *cac2567*), NADH-Oxidase (*cac3408*), NADH:Flavin Oxidoreduktase (*cac1044*) und weiterer vorhergesagter Flavoproteine (*cac2002*, *cac1849*, *cac1498*) über eine breite Vielfalt an Abwehrmechanismen verfügt, um sich bei Auftreten von Sauerstoff und seinen Radikalen in der Umwelt vor dem sofortigen Zelltod zu schützen.

Für Thioredoxin konnte bereits auf Proteinebene eine Induktion nach oxidativem Stress gezeigt werden (Riebe, 2005). *C. pasteurianum* verwendet Thioredoxin um Disulfidgruppen an Enzymen zu reduzieren und so deren Funktion zu regulieren. Thioredoxin muss dazu in reduzierter Form vorliegen. Hierzu werden Ferredoxin und NADH benötigt. Eine Ferredoxin:Thioredoxin Reduktase katalysiert diese Reaktion (Hammel *et al.*, 1983). Vido *et al.* (2005) fanden in einer Thioredoxin-negativen *Lactococcus lactis* Mutante eine Verschiebung im Gehalt verschiedener GAPDH-Isoformen bei Wachstum unter aeroben Bedingungen. Sie fanden zudem heraus, dass die genannten Isoformen durch eine Oxidation des im katalytischen Zentrum befindlichen Cysteins (C<sub>152</sub>) auftraten. Die oxidierte Form wird vermutlich schneller der Proteolyse zugeführt als die aktive nicht-oxidierte Form. Die Induktion eines Operons bestehend aus den Genen *cac1547* [*trxA*, Thioredoxin], *cac1548* [*trxB*, Thioredoxin Reduktase] und *cac1549* [*bsaA*, Glutathion Peroxidase] konnte in *C. acetobutylicum* bereits von Kawasaki *et al.* (2005) gezeigt werden.

Ein weiteres Protein, das an der Regulation von Proteinfunktionen infolge von oxidativem Stress in *C. acetobutylicum* verantwortlich sein könnte, ist Glutaredoxin (*cac2777*). Das Gen für dieses Protein befindet sich in direkter Nachbarschaft des *rd*-Gens (*cac2778*). Glutaredoxine sind kleine, hitzestabile Proteine, denen diverse zelluläre Funktionen zugeschrieben werden. Dies beinhaltet z. B. die Reduktion von Ribonukleotid Reduktase, Zusammenbau von Eisenschwefelzentren und Glutathionylierung bzw. Deglutathionylierung von Proteinen. Letztere Funktion spielt bei der Weiterleitung von Informationen über den Redoxzustand der Zelle eine Rolle (Gallogly *et al.*, 2009). Somit ist auch in *C. acetobutylicum* ein Einfluss solcher oxidativen Stressproteine auf den Stoffwechsel zu vermuten.

### 4.3.2 Eingriff in die Elektronenübertragung

Unter Berücksichtigung der *in vitro* Ergebnisse passt das Stressverhalten der *C. acetobutylicum* *rd*-Defektmutante *int:rd* sehr gut ins Bild. Der Stamm war deutlich empfindlicher gegenüber Sauerstoff als der Wildtyp. Da Rd für den in *C. acetobutylicum* anscheinend sehr bedeutenden Entgiftungsweg von molekularem Sauerstoff über die Flavoproteine FprA1 und FprA2 zur Elektronenübertragung unbedingt notwendig war (keine direkte Reaktion mit NROR möglich), fällt somit dieser Verteidigungsmechanismus weg. Da für die Reaktion von revRbr mit O<sub>2</sub> Rd nicht notwendigerweise erforderlich war, kann trotzdem zu einem Teil O<sub>2</sub> (wenn auch mit geringeren Aktivitäten als dies durch die Flavoproteine der Fall wäre [Hillmann *et al.*, 2009]) direkt entgiftet werden. Eine geringe Fähigkeit zur Entgiftung von O<sub>2</sub> besteht also auch noch in der *rd*-Defektmutante. Im Einklang damit steht ebenfalls die geringere Sauerstoffverbrauchsrate dieses Stammes (2/3 des Wt; 3.6.3). Zugleich zeigt sich auch ein geringer Einfluss auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Toleranz der *rd*-Defektmutante. Im niedrigmolaren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Bereich war eine erhöhte Empfindlichkeit zu beobachten. Dies steht in Übereinstimmung mit einer nur bedingten Abhängigkeit der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Entgiftung von Rd durch revRbr.

Die Überexpression von NROR (*C. acetobutylicum* pTnror) zeigte keinen wesentlichen Effekt auf Sauerstoffverbrauch oder Überleben nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Unter Begasung mit Luft überlebte der *C. acetobutylicum* pTnror etwas besser als der Wildtyp, allerdings wäre aufgrund der zentralen Rolle dieses Proteins in den verschiedenen ROS-Entgiftungswegen ein stärkerer Einfluss zu erwarten gewesen. Im Vergleich zum Wildtyp zeigte *C. acetobutylicum* pTnror ein stark vermindertes Wachstum im Minimalmedium, hindeutend auf eine Beeinflussung des Stoffwechsels durch verstärkte Bildung dieses Proteins in diesem Stamm und evtl. sogar toxische Effekte durch den Eingriff in den NADH-Metabolismus. Offenbar ist NROR in der normalen Zelle jedoch nicht der Faktor, der den Sauerstoffverbrauch limitiert. Es scheint logisch, dass dieser bei allen getesteten Entgiftungsreaktionen eingebundene Faktor auch in ungestressten Zellen in ausreichendem Maße vorgehalten wird, um auf veränderte Umwelteinflüsse reagieren zu können. Dabei muss diese Komponente nicht zwingend in hohen Konzentrationen in der Zelle vorkommen, sondern kann alternativ eine erheblich höhere Wechselzahl als die darauffolgenden Komponenten aufweisen. In beiden Fällen wären keine erheblichen Unterschiede bezüglich der Stresstoleranz bei Erhöhung der NROR-Molekülzahl pro Zelle zu erwarten.

### 4.3.3 Manipulationen der endständigen Proteine

Eine Überexpression von revRbr (*C. acetobutylicum* pTrevrbr3B) zeigte in Übereinstimmung mit den *in vitro* Experimenten sowohl unter O<sub>2</sub>- als auch unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress eine bessere Überlebensfähigkeit als der *C. acetobutylicum* Wildtyp. Unter niedrigen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen und auch nach Luftbegasung konnte ein verstärktes Wachstum im Vergleich zur ungestressten Probe beobachtet werden (3.6.4.1 und 3.6.4.2). Ob dies darauf zurückzuführen ist, dass die Zellen eine beschleunigte Teilung durchführen oder ob der NADH-Verbrauch der Entgiftungsreaktion für die Zelle unter Stress den Vorteil ausmacht, kann hier nicht abschließend geklärt werden. Für *C. acetobutylicum* würde letzteres einen sehr effektiven Weg zur Regeneration von NAD<sup>+</sup> bedeuten und könnte einen ähnlichen Effekt wie eine für einige Sulfatreduzierer beschriebene kleine Atmungskette haben (Cypionka, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass diese Mikroorganismen durch Sauerstoff nicht sofort abgetötet werden, sondern noch Stunden bis Tage überleben können (Cypionka *et al.*, 1985; Battersby *et al.*, 1985). Scheinbar ist molekularer Sauerstoff für diese Bakteriengruppe nicht sehr toxisch ist, viel kritischer sind die herbeigeführten Oxidationen reduzierter Zellkomponenten. Daher ist Sauerstoff wesentlich toxischer für metabolisch aktive Zellen als für ruhende Zellen. Besonders schädigend wirken die an Schwefelgruppen entstehenden Sauerstoffradikale (Carlsson *et al.*, 1979). Allerdings kann unter Umständen auch das Vorhandensein von Sauerstoff von Vorteil sein. Es konnte gezeigt werden, dass *Desulfovibrio* Stämme aerobe Respiration durchführen können (Dannenbergh *et al.*, 1992). Die Substrate für diese Sauerstoffatmung sind normalerweise die gleichen wie die unter Sulfatatmung. Bisher ist bekannt, dass auch H<sub>2</sub>, Formiat, Laktat, Pyruvat, Ethanol, Acetat, Propionat, Butyrat und anorganische Schwefelverbindungen durch Sauerstoff von Sulfatatmern oxidiert werden können und dass auch unter aeroben Bedingungen keine vollständige Oxidation dieser Substrate stattfinden kann, wenn dies anaerob ebenfalls nicht möglich war.

*C. acetobutylicum* pTdfx zeigte ebenfalls eine erhöhte Resistenz gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Abb. R31), höheren Sauerstoffverbrauch (Abb. R29) und einen (wenn auch nur geringen) Einfluss auf die O<sub>2</sub>-Toleranz (Abb. R30). Der erhöhte Sauerstoffverbrauch von *C. acetobutylicum* pTdfx ist nicht sofort zu erklären, da Dfx in den *in vitro* Tests keine direkte Reaktion mit Sauerstoff aufwies. Nichtsdestotrotz kann eine erhöhte Toleranz gegenüber Sauerstoff bzw. Wasserstoffperoxid sekundär durch Dfx verursacht werden. Wahrscheinlich spielen bei der erhöhten Stresstoleranz auch weitere in allen Stämmen schon exprimierte Proteine eine Rolle. Dabei ist es durchaus vorstellbar, dass durch die erhöhte Sauerstoffkonzentration auch in den Zellen des Wildtyps verstärkt Superoxid produziert wird, welches bei nicht ausreichender

Entgiftung Schädigungen hervorruft. Die Erhöhung der Dfx-Konzentration bei *C. acetobutylicum* pTdfx verursacht in dem Fall nur sekundär eine erhöhte Sauerstofftoleranz. Dies würde aber trotzdem nicht zu erhöhtem Sauerstoffverbrauch führen. Dem entgegen steht ebenfalls der erhöhte Sauerstoffkonsum von *C. acetobutylicum* int:dfx.

Beide *C. acetobutylicum* revrbr-Defektmutanten (int:rbr3A/B) zeigten bezüglich der Stresstoleranz keine Unterschiede zum Wildtyp. Das jeweils zweite, noch intakte Gen, reicht offenbar aus um die Funktion von revRbr in der Zelle sicherzustellen.

Der Knockout von *rubY* (*C. acetobutylicum* int:rubY) hatte wie erwartet keine großen Auswirkungen auf die Stresstoleranzen, da dieses Gen auch in den Zellen des Wildtyps nur in geringem Maße exprimiert und nicht nach oxidativem Stress reguliert wird. Die Funktion von RubY ist somit zwar *in vitro* vorhanden, spielt aber offensichtlich *in vivo* nur eine untergeordnete Rolle.

Eine Übersicht über die bisher nachgewiesenen Entgiftungswege für O<sub>2</sub> bzw. ROS in *C. acetobutylicum* findet sich in Abb. D5.

#### **4.4 Beeinflussung des Stoffwechsels von *C. acetobutylicum* durch oxidativen Stress**

Da sich tendenziell in allen untersuchten *C. acetobutylicum* Stämmen (Überexpressionen, Wildtyp und Defektmutanten) eine schnellere Bildung von Lösungsmitteln (Aceton und Butanol) zeigte, scheinen die Auswirkungen von Sauerstoff auf die Stoffwechselendprodukte auf einen allgemeinen Regulationsmechanismus zurückzuführen zu sein. Geringe Konzentrationen Sauerstoff im Medium führten zu einem schnelleren Anstieg der Lösungsmittelkonzentration. Der Lösungsmittelshift fand in allen untersuchten Stämmen in der stationären Wachstumsphase statt.

Die Wirkung von Sauerstoff auf den Stoffwechsel von Clostridien war besonders Anfang des letzten Jahrhunderts Gegenstand von Experimenten. Es konnte gezeigt werden, dass es einigen Clostridien möglich ist Sauerstoff zur Oxidation von reduzierten organischen Substanzen zu verwenden. So wurde schon 1945 von Aubel und Houget gezeigt, dass *C. saccharobutyricum* Glukose in Anwesenheit von O<sub>2</sub> metabolisiert und dabei unter Bildung von Kohlendioxid O<sub>2</sub> verbraucht. Bei diesem Prozess wurde nun allerdings kein H<sub>2</sub> mehr gebildet, wie es normalerweise bei anaerober Fermentation der Glukose entsteht. Ähnliches konnte für *C. butyricum*, *C. sporogenes* und *C. welchii* beobachtet werden (Frenkel und Karpenko, 1953), wobei Glukose wesentlich langsamer metabolisiert wurde als unter anaeroben Bedingungen. In Kulturen von *C. botulinum* und *C. perfringens* reicherte sich



während dieser Umsetzung Pyruvat an (Hirano *et al.*, 1955). Zellfreie Extrakte von *C. kluveri* konnten Ethanol und Butyrat durch Sauerstoff zu Acetoacetat oxidieren. Einer kompletten Zellkultur von *C. kluveri* ging hingegen diese Fähigkeit nach 5 min Belüftung verloren, wohingegen Schütteln unter N<sub>2</sub> oder mit Luft bei zusätzlichem Vorhandensein von Ethanol nicht zu einem Funktionsverlust führte. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass die Anwesenheit des zu oxidierenden Substrats vor einer Inaktivierung der Dehydrogenase durch O<sub>2</sub> schützt (Kennedy und Barker, 1951). Mit der Entdeckung, dass viele metabolische Reaktionen in obligat anaeroben Mikroorganismen durch Ferredoxin-abhängige Enzyme durchgeführt werden, wurde intensiv an den autooxidativen Eigenschaften von Ferredoxin geforscht. Als Ferredoxin-abhängig konnten z. B. die reduktive Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Pyruvat in *C. klyveri* oder *C. aceticum* (Linke, 1969), die Synthese von Formiat aus CO<sub>2</sub> in *C. klyveri* (Jungermann *et al.*, 1970) und die reduktive Stickstofffixierung durch *C. pasteurianum* und andere Anaerobier identifiziert werden (Kennedy *et al.*, 1968).

Die Bildung von Säuren nach Sauerstoffstress wurde in *C. acetobutylicum* bereits relativ gut untersucht. O'Brien und Morris (1971) konnten zeigen, dass *C. acetobutylicum* unter aeroben Bedingungen Pyruvat ausscheidet und dafür die Exkretion von Butyrat einstellt. Letzteres wurde auf die Abnahme des NADH-Spiegels in den Zellen unter aeroben Bedingungen zurückgeführt. Zusätzlich konnte ein Anstieg der Menge an Acetat im Verhältnis zu ungestressten Zellen beobachten werden. In der Glykolyse gewonnenes NADH wird bei der Produktion von Butyrat aus Pyruvat oxidiert. Beim letzten Schritt dieser Reaktion wird durch die Umwandlung von Butyryl-CoA zu Butyrat mittels der Enzyme Phosphotransbutyrylase und Butyrat-Kinase ATP gebildet. Unter stark aeroben Bedingungen wird der Zelle anscheinend zu viel Reduktionskraft in Form von NADH durch die oben beschriebenen Entgiftungsreaktionen für die Reduktion von Sauerstoff bzw. ROS abgezogen, so dass für die Reduktionsschritte bei der Umwandlung von Pyruvat zu Butyrat nicht genug NADH zur Verfügung steht. Dies erklärt den von O'Brien und Morris (1971) beobachteten Anstieg des Acetat-Gehaltes in Verbindung mit der Ausscheidung von Pyruvat anstatt Butyrat und korreliert mit einem Absinken des intrazellulären ATP-Spiegels bei gleichzeitigem Anstieg des ADP-Spiegels. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Auswirkung von oxidativem Stress auf das Produktspektrum konnten hingegen keinen Anstieg der Acetatkonzentration nach Stress zeigen. Die Acetatgehalte waren entgegen der Erwartung in ungestressten Proben tendenziell höher als in gestressten Kulturen. Hingegen konnte eine erhöhte Endkonzentration an Butyrat beobachtet werden. Pyruvat und NADH-Spiegel wurden in der vorliegenden Arbeit nicht bestimmt. Da der Effekt der Produktverschiebung abhängig

von der O<sub>2</sub>-Konzentration im Medium ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Beobachtungen von O'Brien und Morris aufgrund anderer O<sub>2</sub>-Konzentrationen (nicht gesättigt) hier nicht bestätigt werden konnten. Solange der Sauerstoff kontinuierlich in der Lösung durch die Entgiftungswege verbraucht werden kann, kommt es vermutlich nicht zu einer vollständigen Inaktivierung der Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase (PFOR) in welcher die Anreicherung von Pyruvat bei O'Brien und Morris wohl begründet ist (Meinecke *et al.*, 1989) und somit auch nicht zu einem weitreichenden Einfluss auf die untergeordneten Stoffwechselreaktionen hin zu den Säuren und Lösungsmitteln (Abb. D6).

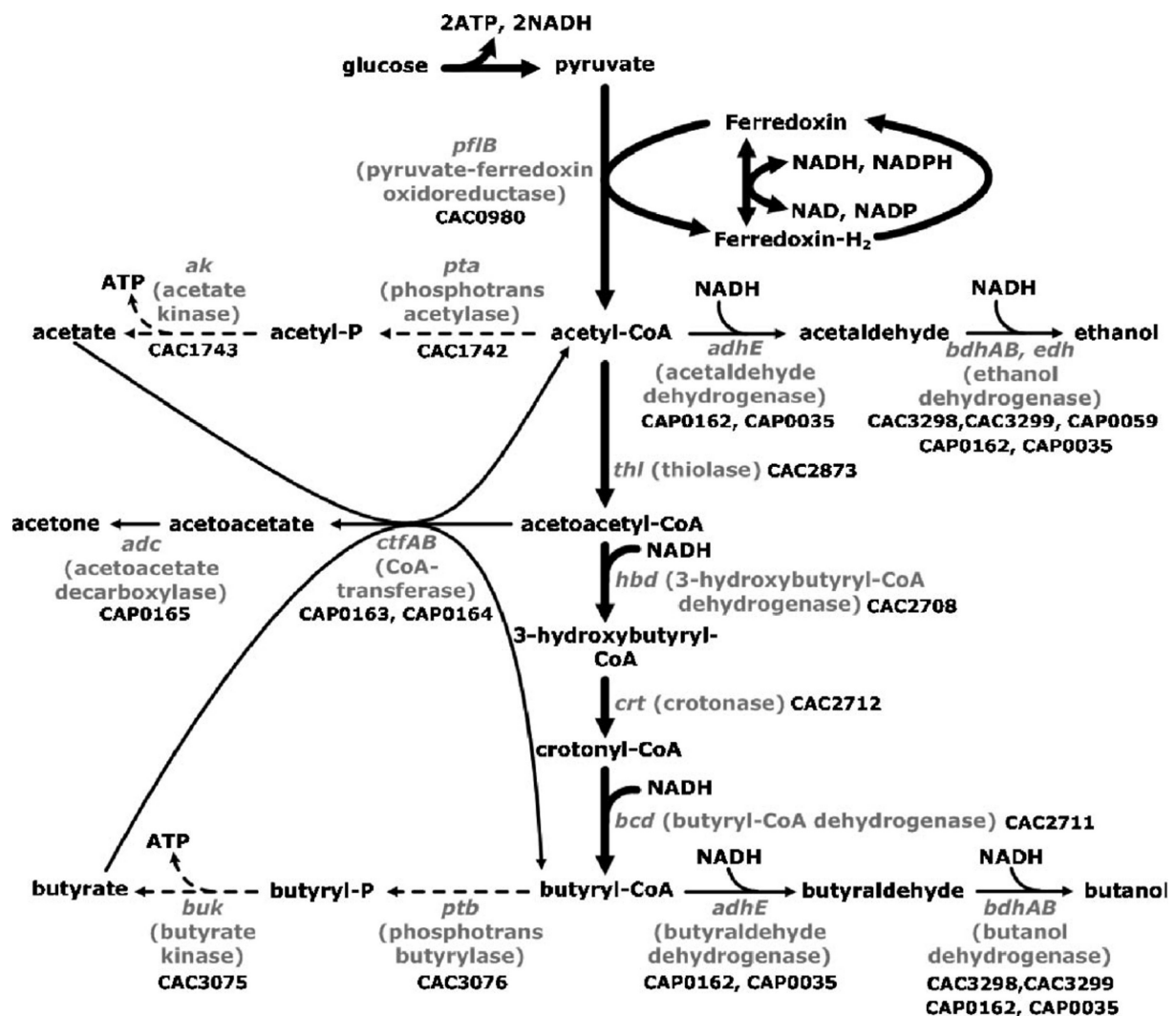


Abb. D6: Metabolismus von *C. acetobutylicum* nach Lee *et al.* (2008).

Nichtsdestotrotz konnte eine leicht erhöhte Ausscheidung von Pyruvat nach Begasung von *C. acetobutylicum* Kulturen mit Luft (60 ml/min) nachgewiesen werden, wobei in den dazu durchgeführten Versuchen durch eine kontinuierliche Begasung vermutlich mehr Sauerstoff

ins Medium eingetragen wurde als durch die in dieser Arbeit gewählte Belüftung durch schütteln (Mann, Universität Rostock, pers. Kommunikation).

Der Beginn der Lösungsmittelbildung in *C. acetobutylicum* ist eng mit dem Einsetzen der Sporulation verbunden. Allerdings sind die zugrundeliegenden Mechanismen bisher nicht entschlüsselt worden. Vermutlich ist ein gemeinsamer Regulator bei der Induktion beider Phänomene beteiligt. Die Regulation der Sporulation wurde bisher besser untersucht als die der Lösungsmittelbildung. Dabei wurden die zugrundeliegenden Mechanismen bei dem nahen Verwandten *Bacillus subtilis* intensiv beforscht. Anscheinend bestehen bei der diesbezüglichen Regulation weitreichende Übereinstimmungen zwischen diesen beiden Sporenbildnern. Wie damit die Bildung von Lösungsmitteln bei *C. acetobutylicum* einhergeht, ist jedoch bisher unklar. Es konnte bereits ein Einfluss verschiedener Sporulationsfaktoren auf die Produktion der *C. acetobutylicum* Stoffwechselendprodukte nachgewiesen werden. In *C. acetobutylicum* konnte gezeigt werden, dass die Lösungsmittelbildung durch einen Transkriptionsfaktor (*spo0A*) reguliert wird, welcher auch maßgeblich an der Initiation der Sporulation beteiligt ist (Bahl *et al.*, 1995). Der Beginn der Lösungsmittelproduktion ist auf eine durch Spo0A vermittelte Aktivierung der Transkription von Acetoacetat Decarboxylase (*adc*), Alkohol Dehydrogenase (*adhE*) und CoA-Transferase (*ctfB*) zurückzuführen (zur Übersicht s. Abb. D6; Sullivan und Bennett, 2006). Spo0A-Defektmutanten waren nicht mehr zur Bildung von Lösungsmitteln und Sporen fähig. Hingegen wurden die Lösungsmittelgene in einem *C. acetobutylicum* Spo0A-Überexpressionsstamm verstärkt exprimiert (Harris *et al.*, 2002).

Die in dieser Arbeit beobachtete frühere Bildung von Aceton und Butanol ist vermutlich ebenfalls durch eine Induktion dieser Gene infolge von oxidativem Stress verursacht. Damit übereinstimmend konnte nach oxidativem Stress eine frühere Sporulation der verschiedenen in dieser Arbeit erzeugten *C. acetobutylicum* Stämme beobachtet werden (3.6.5), wobei nach 48 h ca. 20 % der Zellen nach anaerober Inkubation als Vorsporen in MS-Mes-Medium vorlagen und diese Zahl sich bei aerober Inkubation unabhängig vom vorliegenden *C. acetobutylicum* Stamm auf bis zu 70 % erhöhte. Die Wirkung von ROS oder O<sub>2</sub> auf Spo0A oder seine Expression wurde bisher in *C. acetobutylicum* nicht untersucht.

Ein weiterer potenziell an der Regulation der Lösungsmittelbildung bei oxidativem Stress beteiligter Sporulationsfaktor ist SpoVG. In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits ein erhöhter Level dieses Proteins infolge von Sauerstoffstress in 2D-Gelen gezeigt (Riebe, 2005). SpoVG ist bei der Sporulation als negativer Regulator eingebunden. Dieses Protein inhibiert dabei einen zur asymmetrischen Septierung führenden Mechanismus. In *B. cereus*

konnte eine Induktion infolge von Hitze- und Ethanolstress nachgewiesen werden (Periago *et al.*, 2002). Die Regulation dieses Sporulationsproteins durch Stress scheint somit auch in dem nahen Verwandten vorhanden zu sein. Leider wurde die Induktion nach oxidativem Stress von Periago *et al.* (2002) nicht untersucht. SpoVG ist in *B. subtilis* Repressor von  $\sigma^F$  und inhibiert die asymmetrische Septierung zur Sporenbildung resultierend in weiterem vegetativen Wachstum (Matsuno und Sonenshein, 1999). Auch in *B. subtilis* konnte eine Induktion infolge von Hitzestress gezeigt werden.

In *B. subtilis* ist die Expression von SpoVG kontrolliert durch AbrB (Zuber und Losick, 1987). AbrB (*abrB*, *cac0310*) reguliert wiederum in *C. acetobutylicum* den Übergang zwischen Säure- und Lösungsmittelphase. Ein Knockdown dieses Gens in *C. acetobutylicum* resultierte in erhöhten Acetat- und Butyratgehalten, verbunden mit einer verzögerten Aceton- und Butanolbildung (Scotcher *et al.*, 2005). Demzufolge müsste eine Aktivierung dieses Regulators (AbrB) oder dessen Überexpression zu einer früheren bzw. schnelleren Lösungsmittelproduktion in Verbindung mit niedrigeren Acetat- und Butyratkonzentrationen führen. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten konnte dies (mit Ausnahme eines niedrigeren Acetatgehaltes) durch Produktbestimmungen nach oxidativem Stress beobachtet werden (3.6.5). AbrB agiert in *C. acetobutylicum* während der Sporulation als Gegenspieler von Spo0A, welches in seiner aktivierten Form an 2 Spo0A-Boxen im Promotor von *abrB* bindet und dessen Transkription reprimiert. Neben der Rolle bei der Sporulation sind für AbrB in *B. subtilis* auch Funktionen bei der Katabolitenrepression unter Nährstofflimitation bekannt (Fisher *et al.*, 1994). Denkbar wären solche Prozesse auch bei anderen Stresssituationen (z. B. Hitze- oder oxidativer Stress).

Das Signal, welches in *C. acetobutylicum* zur gleichzeitigen Induktion von Lösungsmittelbildung und Sporulation unter Sauerstoffstress führt, wurde bisher nicht identifiziert. Naheliegender wäre eine durch die Sauerstoffradikale ausgelöste Inaktivierung von Proteinkomponenten. Dies könnte beispielsweise durch Oxidation sauerstoffempfindlicher Aminosäuren (Histidin, Tryptophan, Methionin, Tyrosin und Cystein; Vieira-Silva und Rocha, 2008) oder Eisenschwefelzentren geschehen, wie es bereits für mehrere DNA-bindende Regulatoren nachgewiesen wurde (z. B. PerR [Lee und Helmann, 2006] oder OxyR [Storz *et al.*, 1990]). Ebenso könnte der durch die Entgiftungsreaktionen erhöhte NADH-Verbrauch und somit erniedrigte NADH-Spiegel der Zelle von redoxsensitiven Regulatoren sensiert werden (z. B. Glutaredoxin, s. o.).

In vielen Fällen findet die Regulation der Aktivität von Proteinen (so auch Sporulations- und Transkriptionsfaktoren) durch Phosphorylierung über ein Phosphorelay-System statt. So ist

Spo0A beispielsweise nur in phosphorylierter Form aktiv und bindet an den *abrB*-Promotor resultierend in der Repression der Transkription von *abrB* (Hoch, 1993; Scotcher *et al.*, 2005). Am Wahrscheinlichsten erscheint daher aufgrund der in *B. subtilis* bereits nachgewiesenen Abhängigkeit der Aktivität von Spo0A von dessen Phosphorylierungszustand (Hoch, 1993) und einem in *C. acetobutylicum* durch Sauerstoffstress verursachten Abfall des intrazellulären ATP-Spiegels bei gleichzeitigem Anstieg des ADP-Spiegels (O'Brien und Morris, 1971) ein direkter Einfluss des ATP-Gehaltes der Zelle. Die durch diesen verminderten ATP-Spiegel vermutlich resultierende Änderung des Phosphorylierungszustandes von Sporulationsfaktoren (z. B. Spo0A) kann somit die Induktion der Lösungsmittelbildung hervorrufen.

## 5 Zusammenfassung

### „In vitro“ Analysen

Das vorrangige Ziel dieser Arbeit lag in der Untersuchung eines Reaktionsweges zur Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies in dem obligat anaeroben Prokaryoten *Clostridium acetobutylicum*. Dabei sollte die Beteiligung von Desulfoferrodoxin und reversen Rubrerythrin sowie die Wechselwirkung mit weiteren Proteinkomponenten aufgeklärt werden. Die diesbezüglichen Untersuchungsergebnisse sind im Folgenden zusammengefasst:

#### Erste Teilreaktion (Superoxid-Reduktase, SOR):

Die potenziell an der Entgiftung von  $O_2^-$  in *C. acetobutylicum* beteiligten Proteine NADH:Rubredoxin Oxidoreduktase (NROR), Rubredoxin (Rd) und Desulfoferrodoxin (Dfx) konnten erfolgreich in *E. coli* exprimiert und mit hohen Ausbeuten aufgereinigt werden.

Mittels Datenbankanalysen konnte *C. acetobutylicum* Dfx in die Klasse der 1Fe-SORs eingruppiert werden.

Dfx neigt zur Bildung multimerer Strukturen.

Gereinigtes Dfx zeigt eine vergleichsweise geringe Superoxid-Dismutase Aktivität.

Superoxid kann Cytochrom C in Anwesenheit von Dfx oxidieren. Diese Reaktion wird typischerweise von Superoxid-Reduktasen durchgeführt.

Superoxid und NAD(P)H konnten als Substrate für die in Abhängigkeit von NROR und Rd durch Dfx ausgeführte Superoxid-Reduktase Reaktion nachgewiesen werden.

$H_2O_2$  ist das Produkt der ersten Teilreaktion (Superoxid-Reduktase Reaktion).

#### Zweite Teilreaktion (NAD(P)H-Oxidase/Peroxidase):

Die potenziell an der Entgiftung von  $H_2O_2$  in *C. acetobutylicum* beteiligten Proteine NROR, Rd und reverses Rubrerythrin (revRbr) konnten erfolgreich aufgereinigt werden. Die Aufreinigung eines *C. acetobutylicum* Rubrerythrins mit ursprünglicher Domänenstruktur (RubY) war ebenfalls erfolgreich.

Anders als die meisten bisher untersuchten Rubrerythrine mit ursprünglicher Anordnung der Domänen kommt *C. acetobutylicum* revRbr als Tetramer vor.

Für revRbr konnte in Zymogrammen und in einem NBT-abhängigen Superoxid-Dismutase Test eine geringe SOD-Aktivität nachgewiesen werden.

Gereinigtes revRbr kann durch NADH reduziert werden, wenn NROR im Reaktionsansatz vorhanden ist. Zudem kann revRbr durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Sauerstoff oxidiert werden.

$\text{H}_2\text{O}_2$  wird gegenüber  $\text{O}_2$  von revRbr als Substrat bevorzugt.

NAD(P)H und  $\text{H}_2\text{O}_2$  bzw.  $\text{O}_2$  konnten als Substrate für revRbr bestimmt werden. Für die Ausübung dieser NAD(P)H-Peroxidase bzw. NAD(P)H-Oxidase Reaktionen ist nicht zwingend Rd notwendig. NROR ist in beiden Fällen essenziell.

Die NAD(P)H-Peroxidase Aktivität von revRbr war vergleichbar mit der des RubY. Die NAD(P)H-Oxidase Aktivität hingegen war für revRbr im Vergleich zu RubY viel stärker.

Es gibt Hinweise auf eine direkte Bindung von NROR und revRbr aneinander (Interaktion an *Strep*-Tactin-Säulen).

### **„In vivo“ Analysen**

Es konnten *C. acetobutylicum* Überexpressionsstämme für die Proteine Dfx (pTdfx), NROR (pTnror) und revRbr (pTrevrbr3B) hergestellt werden.

Es wurden die *C. acetobutylicum* Insertionsmutanten int:rd, int:dfx, int:rubY, int:rbr3A und int:rbr3B mit Hilfe einer neu etablierten Methode hergestellt. Die entsprechenden Mutationen wurden mittels PCR unter Verwendung Gen/Gen-spezifischer und Gen/Intron-spezifischer Primer nachgewiesen. Zudem ist der Integrationsnachweis für int:dfx und int:rbr3B durch Southern-Blot erfolgt.

Bezüglich der Toleranz gegenüber  $\text{O}_2$  konnte folgende Abstufung der untersuchten *C. acetobutylicum* Stämme vorgenommen werden: pTrevrbr3B  $3,1 \times 10^1$  > pTdfx  $4,4 \times 10^{-1}$  > pTnror  $2,2 \times 10^{-1}$  > Wt  $1,25 \times 10^{-1}$  > int:rbr3A  $1,15 \times 10^{-1}$  > int:rubY  $1,1 \times 10^{-1}$  > int:dfx  $9 \times 10^{-2}$  > int:rbr3B  $9 \times 10^{-2}$  > int:rd  $4 \times 10^{-3}$ . Der Überexpressionsstamm von revRbr zeigte als einziger nach Begasung sogar einen Anstieg der KBE im Vergleich zur ungestressten Probe. Die rd-Defektmutante zeigte die stärkste Abnahme der Toleranz.

Die Ergebnisse der Toleranztests gegenüber  $\text{O}_2$  korrelieren mit den veränderten Fähigkeiten zum Sauerstoffkonsum der einzelnen Stämme.

Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Toleranz war in *C. acetobutylicum* pTrevrbr3B, pTdxf und int:rd beeinflusst. Der revRbr Überexpressionsstamm zeigte dabei ähnlich wie bei O<sub>2</sub>-Stress unter geringen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen besseres Wachstum als die ungestresste Kontrolle. Zudem war die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Toleranz im Vergleich zum *C. acetobutylicum* Wildtyp erheblich verstärkt. Auch *C. acetobutylicum* pTdxf wies eine erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Toleranz auf. Die rd-Defektmutante zeigte erwartungsgemäß nur eine geringe Abnahme der Toleranz im niedrigmolaren Bereich (vermutlich aufgrund der nicht essenziellen Notwendigkeit des Rd bei Entgiftung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mittels der NAD(P)H-Peroxidase Reaktion durch revRbr).

Das Verhältnis der gebildeten Säuren Acetat/Butyrat war unter O<sub>2</sub>-Stress zugunsten des Butyrats verschoben. Durchschnittlich lag nach 48stündiger Inkubation unter aeroben Bedingungen 43 % mehr Butyrat und 31 % weniger Acetat vor als in einer anaerob angezogenen Kultur.

Sauerstoff hat Einfluss auf das Produktspektrum von *C. acetobutylicum*. O<sub>2</sub> induziert die Lösungsmittelbildung. Nach 48 h lagen die Lösungsmittelkonzentrationen in gestressten Kulturen etwa 37 % über denen von ungestressten Proben. Dabei wurde die maximale Konzentration früher erreicht.

Die Schüttelinkubation hatte im späteren Verlauf ein Austreiben der Lösungsmittel aus der Kultur zur Folge.

Es konnte kein Einfluss von Überexpression oder Knockout auf die Produktzusammensetzung festgestellt werden.

Sauerstoff hat neben der Induktion der Lösungsmittelbildung offenbar auch die Induktion der Sporulation in *C. acetobutylicum* zur Folge.



## 6 Literaturverzeichnis

**Aubel E, Houget J.** 1945. Action de l'oxygene sur les anaerobies stricts I. Consommation d'oxygene par *Clostridium saccharolyticum*. *Rev can biol.* **4**: 488 – 497.

**Azova L G, Gusev M V, Ivoilov V S.** 1970. Response of some *Clostridium* bacteria to molecular oxygen. *Mikrobiologiya.* **39**: 55 – 59.

**Bahl H, Müller H, Behrens S, Joseph H, Narberhaus F.** 1995. Expression of heat shock genes in *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiol Rev.* **17**: 341 – 348.

**Bahl H, Dürre P.** 2001. Clostridia. pp. 49 – 104. In: Mitchell W J (Hrsg.), *Biology and Physiology*, Weinheim, Germany.

**Battersby N S, Malcolm S J, Brown C M, Stanley S O.** 1985. Sulphate reduction in oxic and suboxic North East Atlantic sediments. *FEMS Microbiol Ecol.* **31**: 225 – 28.

**Beauchamp C, Fridovich I.** 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem.* **44**: 276 - 287.

**Bermejo L L, Welker N E, Papoutsakis E T.** 1998. Expression of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 genes in *Escherichia coli* for acetone production and acetate detoxification. *Appl Environ Microbiol.* **64**: 1079 - 1085.

**Bertram J, Dürre P.** 1989. Conjugal transfer and expression of streptococcal transposons in *Clostridium acetobutylicum*. *Arch Microbiol.* **151**: 551 – 557.

**Birnboim H C, Doly J.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513 - 1523.

**Bonomi F, Kurtz D M Jr., Cui X.** 1996. Ferroxidase activity of recombinant *Desulfovibrio vulgaris* rubrerythrin. *J Biol Inorg Chem.* **1**: 67 – 77.

**Bradford M M.** 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem.* **72**: 248 – 254.

**Breznak J A, Costilow R N.** 1994. Physiochemical factors of growth. pp. 137 – 154. In: Gerhardt (Hrsg.), *Methods of general and molecular bacteriology*. American society for Microbiology, Washington D. C.

**Bruschi M, LeGall J.** 1972. Purification and properties of a rubredoxin isolated from *Desulfovibrio vulgaris* (NCIB 8303). *Biochim Biophys Acta.* **263**: 279 - 82.

**Carlioz A, Touati D.** 1986. Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? *EMBO J.* **5** (3): 623 - 630.

**Carlsson J, Granberg G P D, Nyberg G K, Edlund M-J K.** 1979. Bactericidal effect of cysteine exposed to atmospheric oxygen. *Appl Environ Microbiol.* **37**: 383 – 390.

**Chester N, Marshak D R.** 1993. Dimethyl sulfoxide-mediated primer T<sub>m</sub> reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* **209**: 284 – 290.

**Center for structural genomics (JCSG).** 2004. Crystal structure of putative ferritin-like diiron-carboxylate protein (TM1526) from *Thermotoga maritima* at 2.30 Å resolution. Unpublished.

**Coelho A V, Matias P, Fulop V, Thompson A, Gonzalez A, Carrondo M A.** 1997. Desulfoferridoxin structure determined by mad phasing and refinement to 1.9 angstroms resolution reveals a unique combination of a tetrahedral FeS<sub>4</sub> centre with a square pyramidal FeS<sub>4</sub> centre. *Biol Inorg Chem.* **2**: 680

- Coulter E D, Shenvi N V, Kurtz D M Jr.** 1999. NADH peroxidase activity of rubrerythrin. *Biochem Biophys Res Commun.* **255**: 317 - 323.
- Coulter E D, Shenvi N V, Beharry Z M, Smith J J, Prickril B C, Kurtz D M Jr.** 2000. Rubrerythrin-catalyzed substrate oxidation by dioxygen and hydrogen peroxide. *Inorg Chim Acta.* **297**: 231 - 241.
- Coulter E D, Kurtz D M Jr.** 2001. A role for rubredoxin in oxidative stress protection in *Desulfovibrio vulgaris*. Catalytic electron transfer to rubrerythrin and two-iron superoxide reductase. *Arch Biochem Biophys.* **394**: 76 - 86.
- Crouse J, Amrose D.** 1987. Ethanol precipitation: Ammonium an alternative to sodium acetate. *Focus.* **92**: 3 - 5.
- Cypionka H.** 2000. Oxygen respiration by *Desulfovibrio* species. *Annu Rev Microbiol.* **54**: 827 - 848.
- Cypionka H, Widdel F, Pfennig N.** 1985. Survival of sulfate-reducing bacteria after oxygen stress, and growth in sulfatefree oxygen-sulfide gradients. *FEMS Microbiol Ecol.* **31**: 39 - 45.
- Dannenberg S, Kroder M, Cypionka H.** 1992. Oxidation of H<sub>2</sub>, organic compounds and inorganic sulfur compounds coupled to reduction of O<sub>2</sub> or nitrate by sulfate-reducing bacteria. *Arch Microbiol.* **158**: 93 - 99.
- Dilling W, Cypionka H.** 1990. Aerobic respiration in sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* **71**: 123 - 128.
- DeMare F, Kurtz D M Jr, Nordlund P.** 1996. The structure of *Desulfovibrio vulgaris* rubrerythrin reveals a unique combination of rubredoxin-like FeS<sub>4</sub> and ferritin-like diiron domains. *Nat Struct Biol.* **3**: 539 - 546.
- Dolla A, Fournier M, Dermoun Z.** 2006. Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. *J Biotechnol.* **126**: 87 - 100.
- Dower W J, Miller J F, Ragsdale C W.** 1988. High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucl Acids Res.* **16**: 6127 - 6145.
- Dugaiczky A, Boyer H W, Goodman H M.** 1975. Ligation of *Eco*RI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J Mol Biol.* **96**: 171 - 184.
- Emerson J P, Cabelli D E, Kurtz D M Jr.** 2003. An engineered two-iron superoxide reductase lacking the [Fe(SCys)<sub>4</sub>] site retains its catalytic properties *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**: 3802 - 3807.
- Emerson J P, Coulter E D, Phillips R S, Kurtz D M Jr.** 2003. Kinetics of the superoxide reductase catalytic cycle. *J Biol Chem.* **278**: 39662 - 39668.
- Farr S B, Kogoma T.** 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev.* **55**: 561 - 585.
- Fisher S H, Strauch M A, Atkinson M R, Wray L V Jr.** 1994. Modulation of *Bacillus subtilis* catabolite repression by transition state regulatory protein AbrB. *J Bacteriol.* **176**: 1903 - 1912.
- Frenkel G M, Karpenko M K.** 1953. Studies on respiration in non-facultative anaerobic organisms. *Mikrobiol Zh.* **15**: 6 - 16.
- Fournier M, Zhang Y, Wildschut J D, Dolla A, Voordouw J K, Schriemer D C, Voordouw G.** 2003. Function of oxygen resistance proteins in the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *J Bacteriol.* **185**: 71 - 79.
- Gardner P R, Fridovich I.** 1991. Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydratase. *J Biol Chem.* **266**: 1478 - 1483.

- Gallooly M M, Starke D W, Mieyal J J.** 2009. Mechanistic and kinetic details of thiol-disulfide exchange by glutaredoxins and potential mechanisms of regulation. *Antioxid Redox Signal*. [Epub ahead of print]
- Girbal L, Mortier-Barrière I, Raynaud F, Rouanet C, Croux C, Soucaille P.** 2003. Development of a sensitive gene expression reporter system and an inducible promoter-repressor system for *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol.* **69**: 4985 - 4988.
- Girbal L, Von Abendroth G, Winkler M, Benton P M C, Meynial-Salles I, Croux C, Peters J W, Happe T, Soucaille P.** 2005. Homologous and heterologous overexpression in *Clostridium acetobutylicum* and characterization of purified clostridial and algal Fe-only hydrogenases with high specific activities. *Appl Environ Microbiol.* **71**: 2777 – 2781.
- Guedon E, Petitdemange H.** 2001. Identification of the gene encoding NADH-rubredoxin oxidoreductase in *Clostridium acetobutylicum*. *Biochem Biophys Res Commun.* **285**: 496 – 502.
- Gupta N, Bonomi F, Kurtz D M Jr, Ravi N, Wang D L, Huynh B H.** 1995. Recombinant *Desulfovibrio vulgaris* rubrerythrin. Isolation and characterisation of the diiron domain. *Biochemistry.* **34**: 3310 – 3318.
- Grunden A M, Jenney F E Jr, Ma K, Ji M, Weinberg M V, Adams M W.** 2005. *In Vitro* reconstitution of an NADPH-dependent superoxide reduction pathway from *Pyrococcus furiosus*. *Appl Environ Microbiol.* **71**: 1522 - 1530.
- Hagelueken G, Wiehlmann L, Adams T M, Kolmar H, Heinz D W, Tümmeler B, Schubert W D.** 2007. Crystal structure of the electron transfer complex rubredoxin rubredoxin reductase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**: 12276 - 12281.
- Hammel K E, Cornwell K L, Buchanan B B.** 1983. Ferredoxin/flavoprotein-linked pathway for the reduction of thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **80**: 3681 - 3685.
- Hanahan D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **166**: 557 – 580.
- Harris L M, Welker N E, Papoutsakis E T.** 2002. Northern, morphological, and fermentation analysis of spo0A inactivation and overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. *J Bacteriol.* **184**: 3586 – 3597.
- Heap J T, Pennington O J, Cartman S T, Carter G P, Minton N P.** 2007. The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *J Microbiol Methods.* **70**: 452 - 464.
- Hill G B, Osterhout S.** 1972. Experimental effects of hyperbaric oxygen on selected clostridial species. I. *In-vitro* studies. *J Infect Dis.* **125**: 17 - 25.
- Hillmann F, Fischer R-J, Bahl H.** 2006. The rubrerythrin-like protein Hsp21 of *Clostridium acetobutylicum* is a general stress protein. *Arch Microbiol.* **185**: 270 - 276.
- Hillmann F, Fischer R-J, Bahl H.** 2008. PerR acts as a switch for oxygen tolerance in the strict anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. *Mol Microbiol.* **68**: 848 – 860.
- Hillmann F, Riebe O, Fischer R-J, Mot A, Caranto J D, Kurtz D M Jr, Bahl H.** 2009. Reductive dioxygen scavenging by flavo-diiron proteins of *Clostridium acetobutylicum*. *FEBS Lett.* **583**: 241 - 245.
- Hirano S, Inakujerei S, Yoshikawa E.** 1955. Pyruvate metabolism of *C. perfringens*. I. Differences of pyruvate metabolism between aerobic and anaerobic bacteria. *Nippon Saikingaku Zasshi.* **10**: 965, Zitiert in Morris und O'Brien, 1971.
- Ho S N, Hunt H D, Horton R M, Pullen J K, Pease L R.** 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene.* **77**: 51-59

- Hoch J A.** 1993. The phosphorelay signal transduction pathway in the initiation of *Bacillus subtilis* sporulation. *J Cell Biochem.* **51**: 55 - 61.
- Imlay J A.** 2008. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem.* **77**: 755 – 776.
- Imlay J A, Fridovich I.** 1991. DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. *Science.* **240**: 640 - 642.
- Jean D, Briolat V, Reysset G.** 2004. Oxidative stress response in *Clostridium perfringens*. *Microbiology.* **150**: 1649 - 59.
- Jenney F E Jr, Verhagen M F J M, Cui X, Adams M W.** 1999. Anaerobic microbes: oxygen detoxification without superoxide dismutase. *Science.* **286**: 306 – 309.
- Jin S, Kurtz D M Jr, Liu Z J, Rose J, Wang B C.** 2002. X-ray crystal structures of reduced rubrerythrin and its azide adduct: A structure-based mechanism for a non-heme diiron peroxidase. *J Am Chem Soc.* **124**: 9845-9855
- Jin S, Kurtz D M Jr, Liu Z-J, Rose J, Wang B C.** 2004a. Displacement of iron by zinc at the diiron site of *Desulfovibrio vulgaris* rubrerythrin. X-ray crystal structure and anomalous scattering analysis. *J Inorg Biochem.* **98**: 786 - 796.
- Jin S, Kurtz D M Jr, Liu Z-J, Rose J, Wang B C.** 2004b. X-ray crystal structure of *Desulfovibrio vulgaris* rubrerythrin with zinc substituted into the [Fe(SCys)<sub>4</sub>] site and alternative diiron site structures. *Biochemistry.* **43**: 3204 - 3213.
- Jmol:** an open-source Java viewer for chemical structures in 3D. <http://www.jmol.org/>
- Johnson M S, Zhulin I B, Gapuzan M E, Taylor B L.** 1997. Oxygen-dependent growth of the obligate anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *J Bacteriol.* **179**: 5598 – 5601.
- Jungermann K, Kirchniawy H, Thauer R K.** 1970. Ferredoxin dependent CO<sub>2</sub> reduction to formate in *Clostridium pasteurianum*. *Biochem Biophys Res Commun.* **41**: 682 - 689.
- Karnholz A, Kusel K, Gossner A, Schramm A, Drake H L.** 2002. Tolerance and metabolic response of acetogenic bacteria toward oxygen. *Appl Environ Microbiol.* **68**: 1005 – 1009.
- Kawasaki S, Ishikura J, Watamura Y, Niimura Y.** 2004. Identification of O<sub>2</sub>-induced peptides in an obligatory anaerobe, *Clostridium acetobutylicum*. *FEBS Lett.* **571**: 21 - 25.
- Kawasaki S, Nakagawa T, Nishiyama Y, Benno Y, Uchimura T, Komagata K, Kozaki M, Niimura Y.** 1998. Effect of oxygen on the growth of *Clostridium butyricum* (type species of the genus *Clostridium*), and the distribution of enzymes for oxygen and for active oxygen species in clostridia. *J Ferment Bioeng.* **86**: 368 – 372.
- Kawasaki S, Ono M, Watamura Y, Sakai Y, Satoh T, Arai T, Satoh J, Niimura Y.** 2007. An O<sub>2</sub>-inducible rubrerythrin-like protein, rubperoxin, is functional as a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reductase in an obligatory anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. *FEBS Lett.* **581**: 2460 – 2464.
- Kawasaki S, Watamura Y, Ono M, Watanabe T, Takeda K, Niimura Y.** 2005. Adaptive responses to oxygen stress in obligatory anaerobes *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium aminovalericum*. *Appl Environ Microbiol.* **71**: 8442 – 8450.
- Kennedy E P, Barker H A.** 1951. Butyrate oxidation in the absence of inorganic phosphate by *Clostridium kluyveri*. *J Biol Chem.* **191**: 419 - 438.
- Kennedy I R, Morris J A, Mortenson L E.** 1968. N<sub>2</sub> fixation by purified components of the N<sub>2</sub>-fixing system of *Clostridium pasteurianum*. *Biochim Biophys Acta.* **153**: 777 - 786.

- Kurtz D M Jr.** 2003. Oxygen and anaerobes. pp. 128-142. In: Ljungdahl L G, Adams M W, Barton L L, Ferry J G, Johnson M K (Hrsg.). *Biochemistry and physiology of anaerobic bacteria*. Springer-Verlag, New York.
- Kurtz D M Jr.** 2006. Avoiding high-valent iron intermediates: superoxide reductase and rubrerythrin. *J Inorg Biochem.* **100**: 679 - 693.
- Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, Chenna R, McGettigan P A, McWilliam H, Valentin F, Wallace I M, Wilm A, Lopez R, Thompson J D, Gibson T J, Higgins D G.** 2007. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics.* **23**: 2947 - 2948.
- Laemmli U K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680 – 685.
- Lee J W, Helmann J D.** 2006. The PerR transcription factor senses H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature.* **440**: 363 – 367.
- LeGall J, Prickril B C, Moura I, Xavier A V, Moura J J, Huynh B H.** 1988. Isolation and characterization of rubrerythrin, a non-heme iron protein from *Desulfovibrio vulgaris* that contains rubredoxin centers and a hemerythrin-like binuclear iron cluster. *Biochemistry.* **27**: 1636 - 1642.
- Lehmann Y, Meile L, Teuber M.** 1996. Rubrerythrin from *Clostridium perfringens*: cloning of the gene, purification of the protein, and characterization of its superoxide dismutase function. *J Bacteriol.* **178**: 7152 - 7158.
- Linke H A B.** 1969. CO<sub>2</sub>-Fixierung durch *Clostridium aceticum*: <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Kurzzeiteinbau und Pyruvatstoffwechsel. *Archiv für Mikrobiologie.* **64**: 203.
- Liu M Y, LeGall J.** 1990. Purification and characterization of two proteins with inorganic pyrophosphatase activity from *Desulfovibrio vulgaris*: rubrerythrin and a new, highly active, enzyme. *Biochem Biophys Res Commun.* **171**: 313 – 318.
- Lombard M, LeTouati D, Fontecave M, Nivière V.** 2000a. Reaction of the desulfoferrodoxin from *Desulfoarculus baarsii* with superoxide anion. *J Biol Chem.* **275**: 115 – 121.
- Lombard M, LeTouati D, Fontecave M, Nivière V.** 2000b. Superoxide reductase as a unique defense system against superoxide stress in the microaerophile *Treponema pallidum*. *J Biol Chem.* **275**: 27021 – 27026.
- Lumppio H L, Shenvi N V, Garg R P, Summers A O, Kurtz D M Jr.** 1997. A rubrerythrin operon and nigerythrin gene in *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). *J Bacteriol.* **179**: 4607 - 4615.
- Lumppio H L, Shenvi N V, Summers A O, Voordouw G, Kurtz D M Jr.** 2001. Rubrerythrin and rubredoxin oxidoreductase in *Desulfovibrio vulgaris*: a novel oxidative stress protection system. *J Bacteriol.* **183**: 101 – 108.
- Lyer R B, Silaghi-Dumitrescu R, Kurtz D M Jr, Lanzilotta W N.** 2005. High-resolution crystal structures of *Desulfovibrio vulgaris* nigerythrin: Facile, redox-dependent iron movement, domain interface variability, and peroxidase activity in the rubrerythrins. *J Biol Inorg Chem.* **10**: 407 - 416.
- Madigan M T, Martonko J M, Parker J.** 1999. Biology of microorganisms. 9<sup>th</sup>, Prentice-Hall International Verlag, New York.
- Massey V, Strickland S, Mayhew S G, Howell L G, Engel P C, et al.** 1969. The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun.* **36**: 891 – 897.
- Matsuno K, Sonenshein A L.** 1999. Role of SpoVG in asymmetric septation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **181**: 3392 – 3401.

- May A, Hillmann F, Riebe O, Fischer R-J, Bahl H.** 2004. A rubrerythrin-like oxidative stress protein of *Clostridium acetobutylicum* is encoded by a duplicated gene and identical to the heat shock protein Hsp21. *FEMS Microbiol Lett.* **238**: 249 – 254.
- McCord J M, Fridovich I.** 1988. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). *Free Radic Biol Med.* **5**: 363 – 369.
- Meinecke B, Bertram J, Gottschalk G.** 1989. Purification and characterization of the pyruvate-ferredoxin oxidoreductase from *Clostridium acetobutylicum*. *Arch Microbiol.* **152**: 244 - 250.
- Mermelstein L D, Papoutsakis E D.** 1993. *In vivo* methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* phage phi 3T I methyltransferase to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol.* **59**: 1077 - 1081.
- Mermelstein L D, Welker N E, Bennett G N, Papoutsakis E T.** 1992. Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Bio/Technol.* **10**: 190 – 195.
- Mohr G, Smith D, Belfort M, Lambowitz A M.** 2000. Rules for DNA target-site recognition by a lactococcal group II intron enable retargeting of the intron to specific DNA sequences. *Genes & Dev.* **14**: 559 - 573.
- Monot F, Martin J-R, Petitdemange H, Gay R.** 1982. Acetone and butanol production of *Clostridium acetobutylicum* in a synthetic medium. *Appl Environ Microbiol.* **44**: 1318 – 1324.
- Morris J G, O'Brien R W.** 1971. Oxygen and Clostridia: a review. pp. 1 – 38. In: Barker A N, Gould G W, Wolf J (Hrsg.). *Spore Research*. New York and London: Academic Press.
- Nölling J, Breton G, Omelchenko M V, Makarova K S, Zeng Q, Gibson R, Lee H M, Dubois J, Qiu D, Hitti J, Wolf Y I, Tatusov R L, Sabathe F, Doucette-Stamm L, Soucaille P, Daly M J, Bennett G N, Koonin E V, Smith D R.** 2001. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol.* **183**: 4823 - 4838.
- O'Brien R W, Morris J G.** 1971. Oxygen and the growth and metabolism of *Clostridium acetobutylicum*. *J General Microbiol.* **68**: 307 – 318.
- Oultram J D, Loughlin M, Swinfield T-J, Brehm J K, Thomson D E, Minton N P.** 1988. Introduction of plasmids into whole cells of *Clostridium acetobutylicum* by electroporation. *FEMS Microbiol Lett.* **56**: 83 – 88.
- Periago P M, Van Schaik W, Abee T, Wouters J A.** 2002. Identification of Proteins Involved in the Heat Stress Response of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Appl Environ Microbiol.* **68**: 3486 – 3495.
- Perutka J, Wang W, Goerlitz D, Lambowitz A M.** 2004. Use of computer-designed group II introns to disrupt *Escherichia coli* DExH/D-box protein and DNA helicase genes. *J Mol Biol.* **336**: 421 - 439.
- Pianzzola M J, Soubes M, Touati D.** 1996. Overproduction of the *rbo* gene product from *Desulfovibrio* species suppresses all deleterious effects of lack of superoxide dismutase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **178**: 6736 - 6742.
- Riebe O.** 2005. Heterologe Expression und Analyse reverser Rubrerythrine und Untersuchung des oxidativen Stress-Proteoms von *Clostridium acetobutylicum*. Diplomarbeit. Universität Rostock.
- Riebe O, Fischer R-J, Bahl H.** 2007. Desulfoferredoxin from *Clostridium acetobutylicum* functions as a superoxide reductase. *FEBS Lett.* **581**: 5605 - 5610.
- Riebe O, Fischer R-J, Wampler D A, Kurtz D M Jr, Bahl H.** 2009. Pathway for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> detoxification in *Clostridium acetobutylicum*. *Microbiology.* **155**: 16 – 24.

- Rocha E R, Selby T, Coleman J P, Smith C J.** 1996. The oxidative stress response in an anaerobe, *Bacteroides fragilis*: a role for catalase in protection against hydrogen peroxide. *J Bacteriol.* **178**: 6895 – 6903.
- Romao C V, Liu M Y, LeGall J, Gomes C M, Braga V, Pacheco I, Xavier A V, Teixeira M.** 1999. The superoxide dismutase activity of desulfoferrodoxin from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. *Eur J Biochem.* **261**: 438 - 443.
- Roos J W, McLaughlin J K, Papoutsakis E T.** 1985. The effect of pH on nitrogen supply, cell lysis and solvent production in fermentations of *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol Bioeng.* **2**: 681 – 694.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T.** 1989. Molecular cloning: al laboratory manual. 2<sup>nd</sup>, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor, New York.
- Schmidt T G M, Skerra A.** 1993. The random peptide library-assisted engeneering of a C-terminal affinity peptid, useful for the detection and purification of a functional Ig F<sub>v</sub> fragment. *Prot Engineering.* **6**: 109 – 122.
- Schmidt T G M, Skerra A.** 2007. The *Strep*-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nature Protocols.* **2**: 1528 - 1535.
- Scotcher M C, Rudolph F B, Bennett G N.** 2005. Expression of *abrB310* and *sinR*, and effects of decreased *abrB310* expression on the transition from acidogenesis to solventogenesis, in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol.* **71**: 1987 – 1995.
- Seaver L C, Imlay J A.** 2001. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **183**: 7173 – 7181.
- Shapiro A L, Vinuela E, Maizel J V Jr.** 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun.* **28**: 815 – 820.
- Sieker L C, Holmes M, LeTrong I, Turley S, Santarsiero B D, Liu M Y, LeGall J, Stenkamp R E.** 1999. Alternative metal-binding sites in rubrerythrin. *Nature structural biology.* **6**: 308 – 309.
- Smith A L, Rosenberg I, Averill D R, Moxon E R, Stossel T, Smith D H.** 1974. Brain polymorphonuclear leukocyte quantitation by peroxidase assay. *Infect Immun.* **10**: 356 - 360.
- Southern E M.** 1975. Detection of specific sequences among fragments separated by gelelectrophoresis. *J Mol Biol.* **98**: 503 – 517.
- Storz G, Imlay J A.** 1999. Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol.* **2**: 188 – 194.
- Storz G, Tartaglia L A, Farr S B, Ames B N.** 1990. Bacterial defenses against oxidative stress. *Trends Genet.* **6**: 363 – 368.
- Sullivan L, Bennett G N.** 2006. Proteome analysis and comparison of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Spo0A strain variants. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **33**: 298 – 308.
- Sztukowska M, Bugno M, Potempa J, Travis J, Kurtz D M Jr.** 2002. Role of rubrerythrin in the oxidative stress response of *Porphyromonas gingivalis*. *Mol Microbiol.* **44**: 479 - 88.
- Tally F P, Stewart P R, Sutter V L, Rosenblatt J E.** 1975. Oxygen tolerance of fresh clinical anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol.* **1**: 161– 164.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **76**: 4350 – 4354.

- Tummala S B, Welker N E, Papoutsakis E T.** 1999. Development and characterization of a gene expression reporter system for *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol.* **65**: 3793 -3799.
- Valentine J S, Wertz D L, Lyons T J, Liou L L, Goto J J, Gralla E B.** 1998. The dark side of dioxygen biochemistry. *Curr Opin Chem Biol.* **2**: 253 - 262.
- Van Beeumen J J, Van Driessche G, Liu M Y, LeGall J.** 1991. The primary structure of rubrerythrin, a protein with inorganic pyrophosphatase activity from *Desulfovibrio vulgaris*. Comparison with hemerythrin and rubredoxin. *J Biol Chem.* **266**: 20645 - 20653.
- Vido K, Diemer H, Van Dorsselaer A, Leize E, Juillard V, Gruss A, Gaudu P.** 2005. Roles of Thioredoxin Reductase during the Aerobic Life of *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol.* **187**: 601 - 610.
- Voordouw J K, Voordouw G.** 1998. Deletion of the *rbo* gene increases the oxygen sensitivity of the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Appl Environ Microbiol.* **64**: 2882 – 2887.
- Warkentin M, Freese H M, Karsten U, Schumann R.** 2007. New and fast method to quantify respiration rates of bacterial and plankton communities in freshwater ecosystems by using optical oxygen sensor spots. *Appl Environ Microbiol.* **73**: 6722 – 6729.
- Weinberg M V, Jenney F E Jr, Cui X, Adams M W.** 2004. Rubrerythrin from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* is a rubredoxin-dependent, iron-containing peroxidase. *J Bacteriol.* **186**: 7888 - 7895.
- Wefers H, Sies H.** 1983. Oxidation of glutathione by the superoxide radical to the disulfide and the sulfonate yielding singlet oxygen. *Eur J Biochem.* **137**: 29 - 36.
- Widdel F, Hansen T A.** 1992. The dissimilatory sulfate- and sulfurreducing bacteria, pp. 583 – 624. In Balows A, Trüper H G, Dworkin M, Harder W, Schleifer K H (Hrsg.), *The prokaryotes*, 2nd ed. Springer-Verlag, New York, N.Y.
- Woods D R, Jones D T.** 1986. Physiological responses of *Bacteroides* and *Clostridium* strains to environmental stress factors. *Adv Microb Physiol.* **28**: 1 – 64.
- Vieira-Silva S, Rocha E P.** 2008. An assessment of the impacts of molecular oxygen on the evolution of proteomes. *Mol Biol Evol.* **25**: 1931 - 42.
- Yeh A P, Hu Y, Jenney F E Jr, Adams M W, Rees D C.** 2000. Structures of the superoxide reductase from *Pyrococcus furiosus* in the oxidized and reduced states. *Biochemistry* **39**: 2499 - 2508.
- Zhong J, Karberg M, Lambowitz A M.** 2003. Targeted and random bacterial gene disruption using a group II intron (targetron) vector containing a retrotransposition-activated selectable marker. *Nucleic Acids Research.* **31**: 1656 – 1664.
- Zuber P, Losick R.** 1987. Role of AbrB in Spo0A- and Spo0B-dependent utilization of a sporulation promoter in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **169**: 2223 - 2230.



## 6 Anhang

Vektorkarten der in *Escherichia coli* und *Clostridium acetobutylicum* verwendeten Plasmide:

### 1. IBA-Vektoren (Expressionsvektor)

Abb. A1 (a)

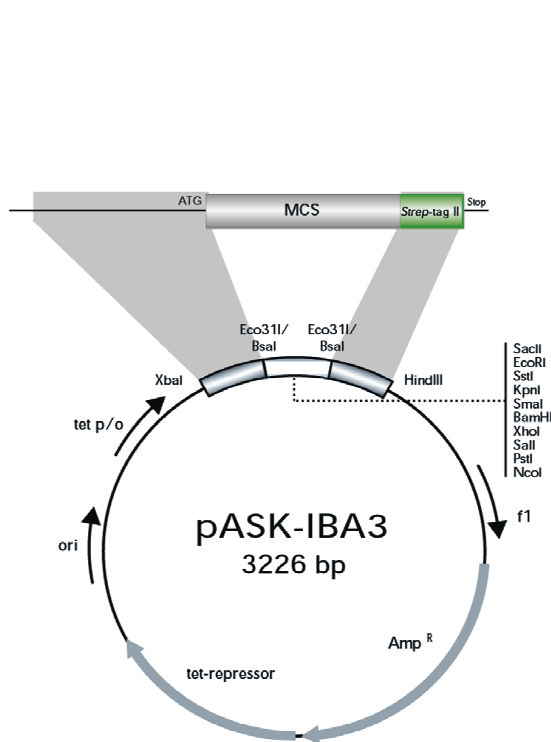


Abb. A1 (a)

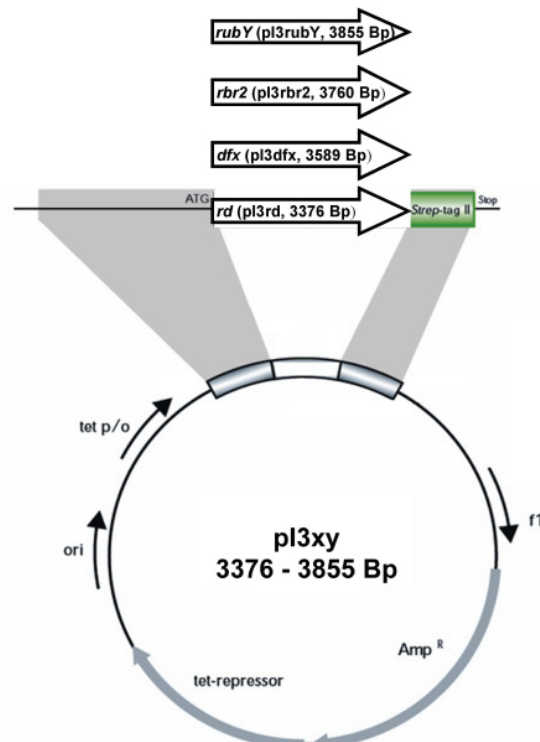


Abb. A1 (b)

### Abb. A1: pASK-IBA3-Vektoren

- (a) Expressionsvektor pASK-IBA3, C-terminaler *Strep*-TagII, cytoplasmatische Lokalisation des Fusionsproteins.
- (b) In dieser Arbeit erzeugte Derivate von pASK-IBA3 (pI3rd, pI3dfx, pI3rubY, pI3rbr2). Das Plasmid beinhaltet: tet p/o, Promotor/Operator des *tetA*-Gens; Amp<sup>R</sup> (=Ap<sup>R</sup>), *bla*-Gen; *tet*-Repressorgen; pUC-Replikationsursprung. Induktor: Anhydrotetracyclin. Aufreinigung des heterologen *Strep*-TagII-Proteins mit Hilfe von *Strep*-Tactin-Sepharose. Weitere Informationen: [www.iba-go.de](http://www.iba-go.de); IBA GmbH, Göttingen.

## 2. pT-Vektoren (Expressionsvektor)

Abb. A2 (a)

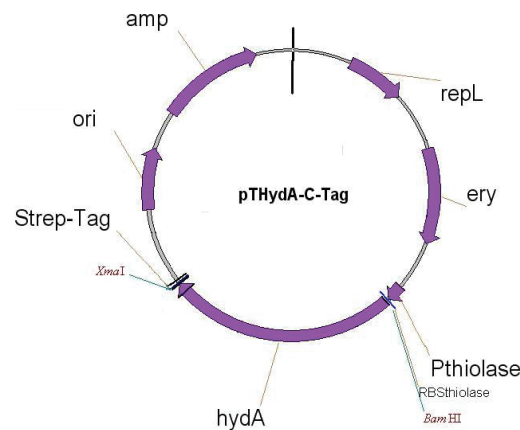
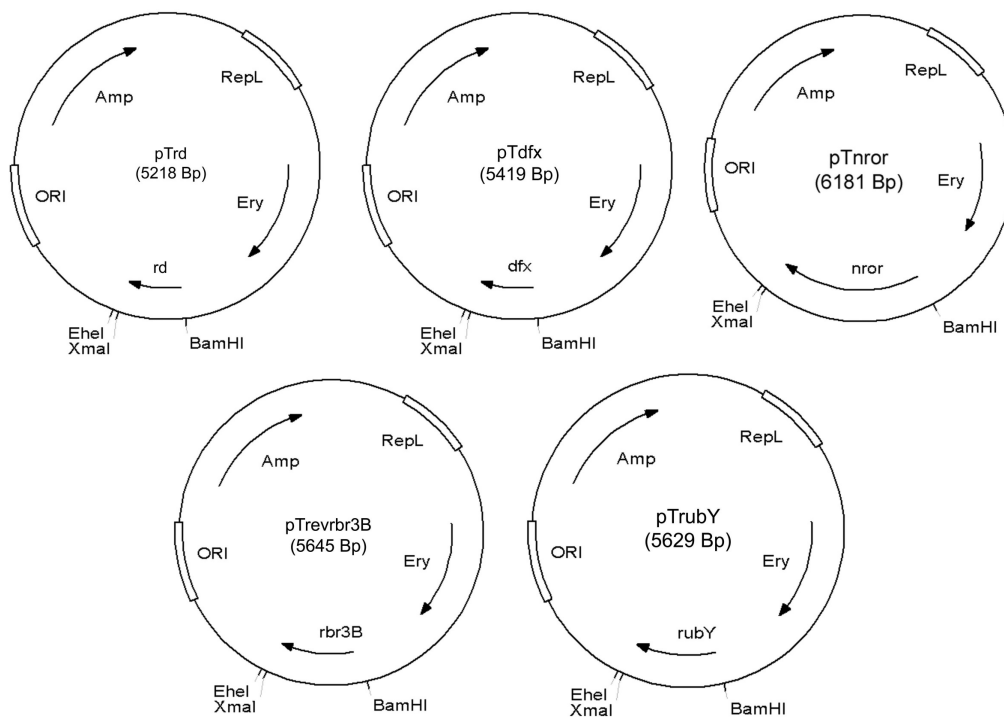
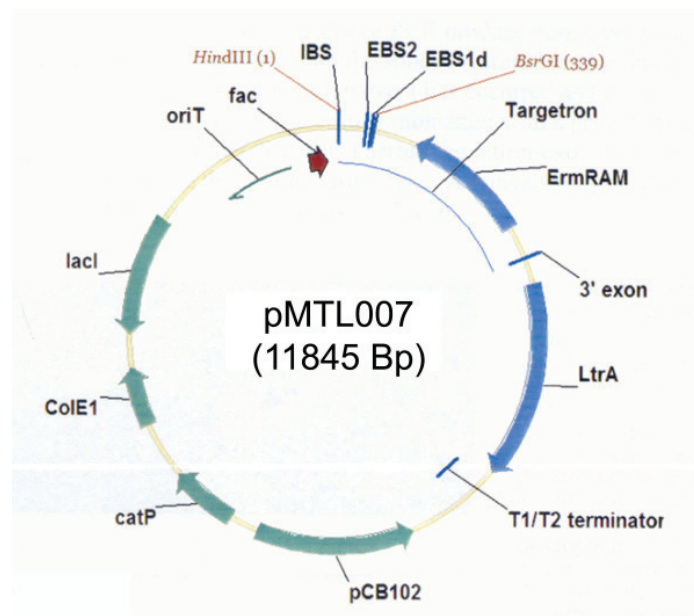


Abb. A2 (b)

Abb. A2: pT-Vektoren (Girbal *et al.*, 2005)

- (a) Expressionsvektor pThyA. Dieser Vektor enthält das *hydA*-Gen von *C. acetobutylicum*. Fragmente können mittels Doppelverdau durch die Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Xma*I (= *Cfr*9I) inseriert werden. Das *hydA*-Gen wird dadurch extrahiert. Expression inserierter Fragmente erfolgt vom *thlA*-Promotor. C-terminaler Strep-TagII, Amp<sup>R</sup> (=Ap<sup>R</sup>, 100 µg/ml) für Selektion in *E. coli*, Erythromycin Resistenz (Ery = Em<sup>R</sup>, 40 µg/ml) für Selektion in *C. acetobutylicum*. Größe 6772 Bp. Die Expression des Proteins ist konstitutiv. Aufreinigung über Strep-Tactin-Sepharose-Säulen durch C-terminalen Strep-TagII.
- (b) In dieser Arbeit erzeugte Derivate von pThyA (pTrd, pTdfx, pTnrar pTrubY, pTrevrbr3B).

### 3. pMTL007 (Mutationsvektor)



**Abb. A3: Plasmid pMTL007** (Heap *et al.*, 2007)

Dieses Plasmid ermöglicht den gezielten Knockout von Genen in Clostridien. Dies erfolgt durch Insertionsmutagenese mittels Gruppe-II-Intron (Targetron). Die auf dem Plasmid kodierte L.ltrB-Erkennungssequenz des „Targetrons“ kann an die Erkennung anderer Gene angepasst werden. Eine Extraktion der ursprünglichen Erkennungssequenz kann durch Restriktion mit *HindIII* und *Bsp1407I* (= *BsrGI*) erfolgen. Anschließend kann eine angepasste Intron-Erkennungssequenz inseriert werden. Die Anpassung der Erkennungssequenz erfolgt nach Erstellung der benötigten Primer auf der Website von Sigma-Aldrich durch SOE-PCR unter Verwendung der spezifischen Primer IBS, EBS1d und EBS2, sowie einem im Mutationskit von Sigma-Aldrich enthaltenen 4. Primer EBS-Universal.

Plasmidtragende *E. coli* DH5 $\alpha$ . Stämme können auf ihre plasmidvermittelte Antibiotikaresistenz (Cm<sup>R</sup>, 25  $\mu$ g/ml) selektiert werden. Für Transformation des Plasmids in *C. acetobutylicum* ist eine Methylierung in *E. coli* ER2275 (pANII) notwendig. Die Expression des Introns muss mit IPTG induziert werden (*fac*-Promotor). Die anschließende Selektion von *C. acetobutylicum* Mutanten erfolgt mittels intronvermittelter Erythromycin Resistenz (Em<sup>R</sup>, 40  $\mu$ g/ml).

**Tab. A1: PCR-Oligonukleotide**

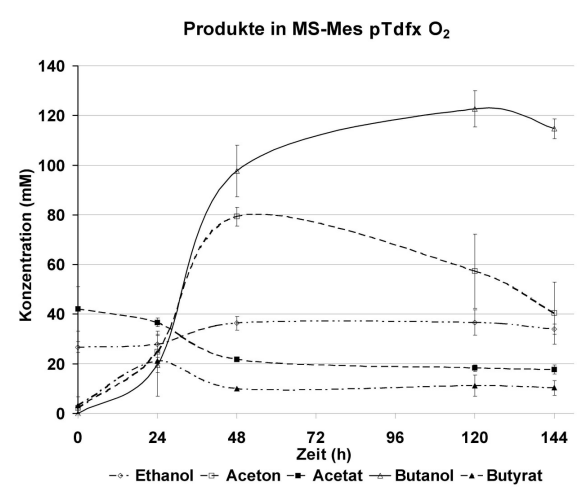
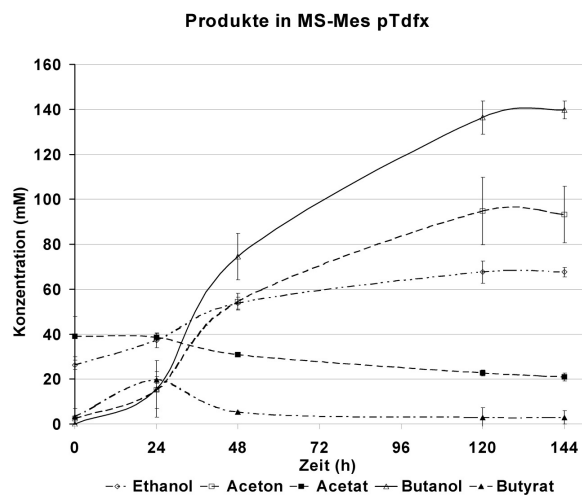
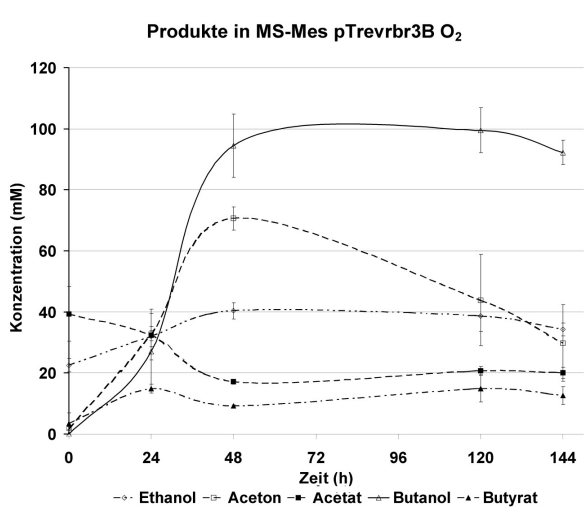
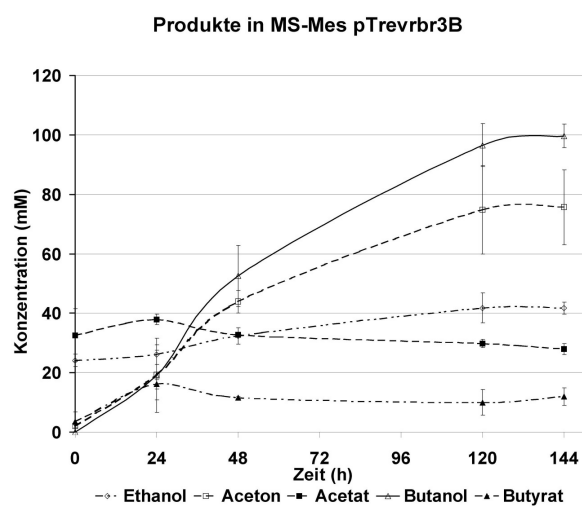
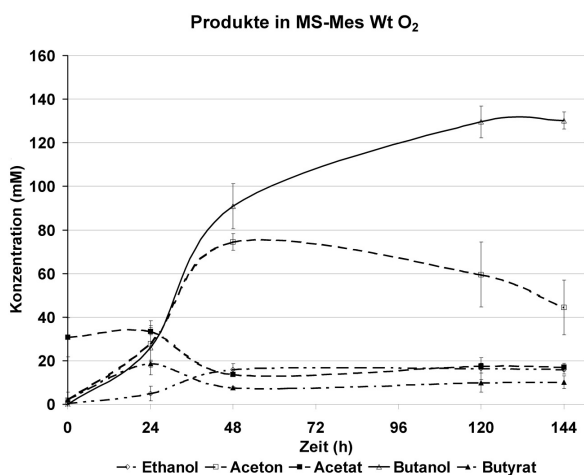
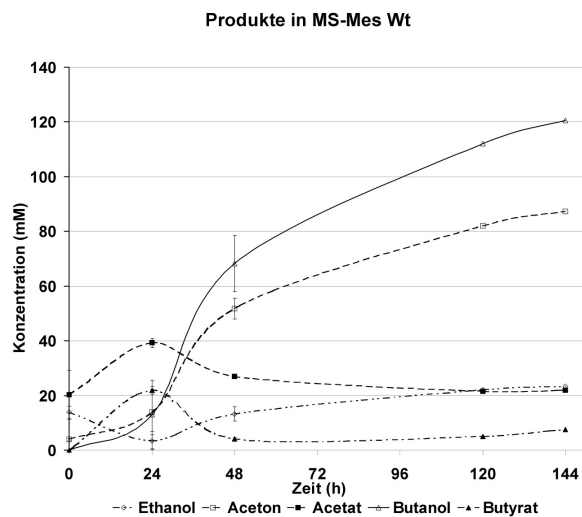
Gen	Name	Nt	Sequenz 5'-3' *	Bp	Vektor
<b>rd</b>	Rd_Fw_BamHI	31	CATTggatccATGGTATATCCCAATAAAAGG	183	IBA3
	Rd_Rev_PstI	29	AATTTctgcagTTCTTCAGATGGCTCAAA		
	Rd_FwAR_BamHI	29	GGCAggatccATGAAAAAATATGTTTGTG	182	pT
	Rd_RevAR_XmaI	25	ATTTcccgggTTCTTCAGATGGCTC		
<b>dfx</b>	Dfx_Fw_KpnI	29	GGTAggtaccATGAATAACGATTTATCAA	396	IBA3
	Dfx_Rew_BamHI	25	GCTCAGgatccTATATCTGCTTTCC		
	Dfx_FwAR_BamHI	30	GGTAggtaccATGAATAACGATTTATCAAT	395	pT
	Dfx_RevAR_XmaI	28	CTCAcccgggTATATCTGCTTTCCATAG		
<b>nrer</b>	NROR_Fw_KpnI	35	CCTCggtaccATGAAATTATCGCGAAAAATAAATC	1159	IBA3
	NROR_Rev_BamHI	41	TAAATTggatccTAAATTATTTAATATTGCATCTAA AGATG		
	NROR_Fw_BamHI	30	GATGggatccATGAAAAGCACAAAAATTTT	1159	pT
	NROR_Rev_XmaI	33	TAAATTcccgggTAAATTATTTAATATTGCATC		
<b>rubY</b>	RubY_Fw_BamHI	28	GAGGggatccATGAAATCACTTAAAGGT	606	IBA3
	RubY_Rev_PstI	40	CTTATctgcagATAGTTTTCACTTAATATTTCAAAA TATG		
	RubY_FwAR_BamHI	27	GAGGggatccATGAAATCACTTAAAGG	606	pT
	RubY_RevAR_XmaI	32	CTTATcccgggATAGTTTTCACTTAATATTTC		
<b>rbr2</b>	Rbr2_Fw_BamHI	31	GTATggatccATGAGTTAAAAATGCAATGAC	572	IBA3
	Rbr2_Rev_PstI	35	GTACctgcagGAAAGCTTGAAATTTATCCTTTTTTA		
	Rbr2_FwAR_BamHI	27	GTATggatccATGAGTGTTAAAAATGC	572	pT
	Rbr2_RevAR_XmaI	28	GTACcccgggGAAAGCTTGAATTTATCC		
<b>revrbr</b>	Rbr_Fw_BamHI	32	GAAAggatccATGAAAAATTTAAATGTGTTG	563,	pT
	Rbr_Rev_XmaI	33	TTATcccgggTTTGAAATATCTGTTTAATAAAC	1183	

\* Die eingefügten Restriktionsschnittstellen sind in Tabelle R1 klein dargestellt.

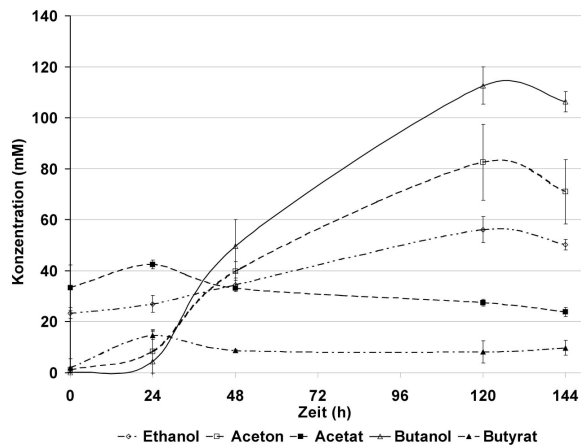
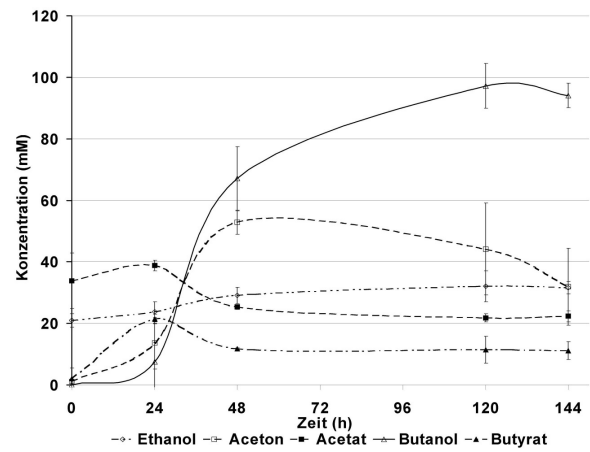
**Tab. A2: Mutationsprimer**

Zielgen		Insertions- Primernamen / Primersequenz stelle
<i>rd</i>	66/67s*	<b>Rd66/67sIBS</b> AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAGATCCCGATAATGTGCGCCCAGATAGGGTG <b>Rd66/67sEBS1d</b> CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCGATAATGGTAACTTACCTT TCTTTGT <b>Rd66/67sEBS2</b> TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTGGATCTCGATAGAGGAAAGTGTCT
<i>dfx</i>	153/154s*	<b>Dfx153/154sIBS</b> AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAAAGCACGTACCAGTGCGCCCAGATAGGGTG <b>Dfx153/154sEBS1d</b> CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCGTACCACATAACTTACCTT TCTTTGT <b>Dfx153/154sEBS2</b> TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTGCTTTTCGATAGAGGAAAGTGTCT
<i>nrer</i>	448/449a <sup>#</sup>	<b>NROR448/449aIBS</b> AAAAAAGCTTATAATTATCCTTACTATACCTAAGAGTGCGCCCAGATAGGGTG <b>NROR448/449aEBS1d</b> CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCCTAAGATATAACTTACCTT TCTTTGT <b>NROR448/449aEBS2</b> TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTTATAGTCGATAGAGGAAAGTGTCT
<i>rubY</i>	246/247s*	<b>RubY246/247sIBS</b> AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAATGCTCGACAAAGTGCGCCCAGATAGGGTG <b>RubY246/247sEBS1d</b> CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCGACAACTTAACTTACCTT TCTTTGT <b>RubY246/247sEBS2</b> TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTAGCATCCGATAGAGGAAAGTGTCT
<i>revrbr</i>	171/172s*	<b>RevRbr171/172sIBS</b> AAAAAAGCTTATAATTATCCTTAGTAGACAAAGAAGTGCGCCCAGATAGGGTG <b>RevRbr171/172sEBS1d</b> CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCAAAGAAGTTAACTTACCTT TCTTTGT <b>RevRbr171/172sEBS2</b> TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTCTACTCGATAGAGGAAAGTGTCT

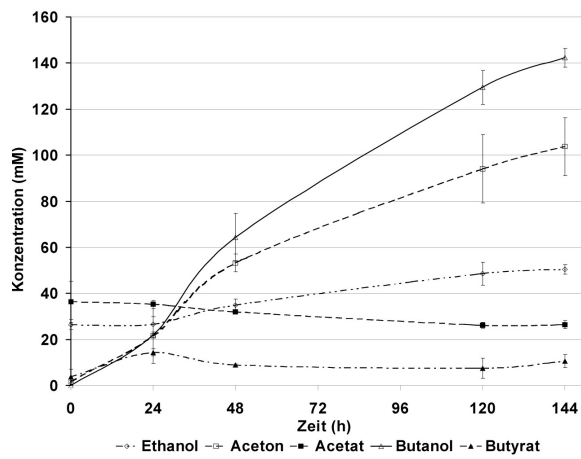
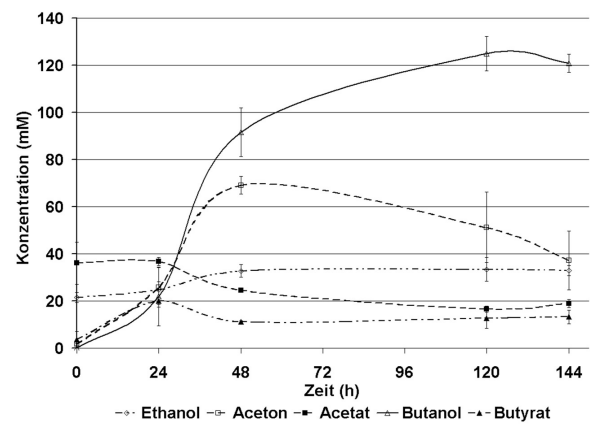
s\* die Insertion des Gruppe-II-Introns erfolgte im Sense-Strang des Gens; a<sup>#</sup> die Insertion des Gruppe-II-Introns erfolgte im Antisense-Strang des Gens.



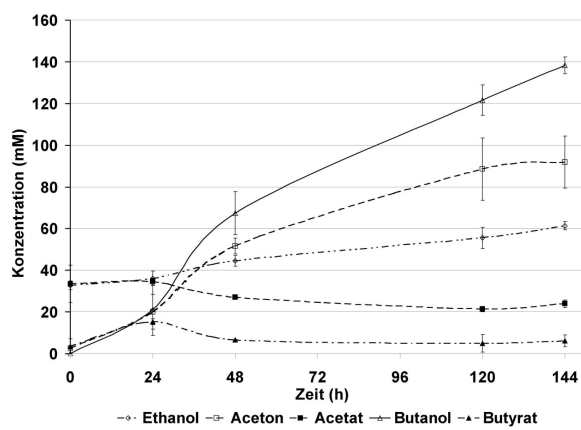
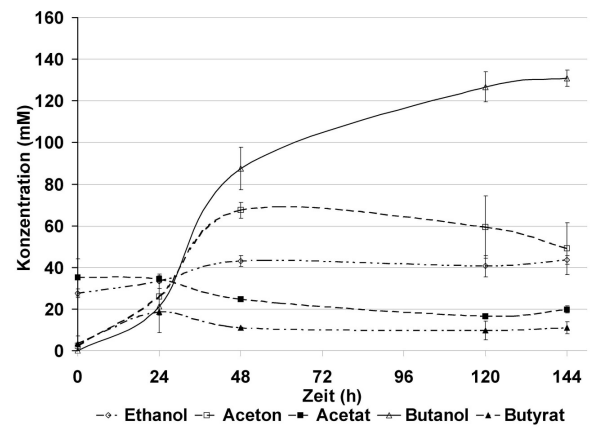
Produkte in MS-Mes pTnrr

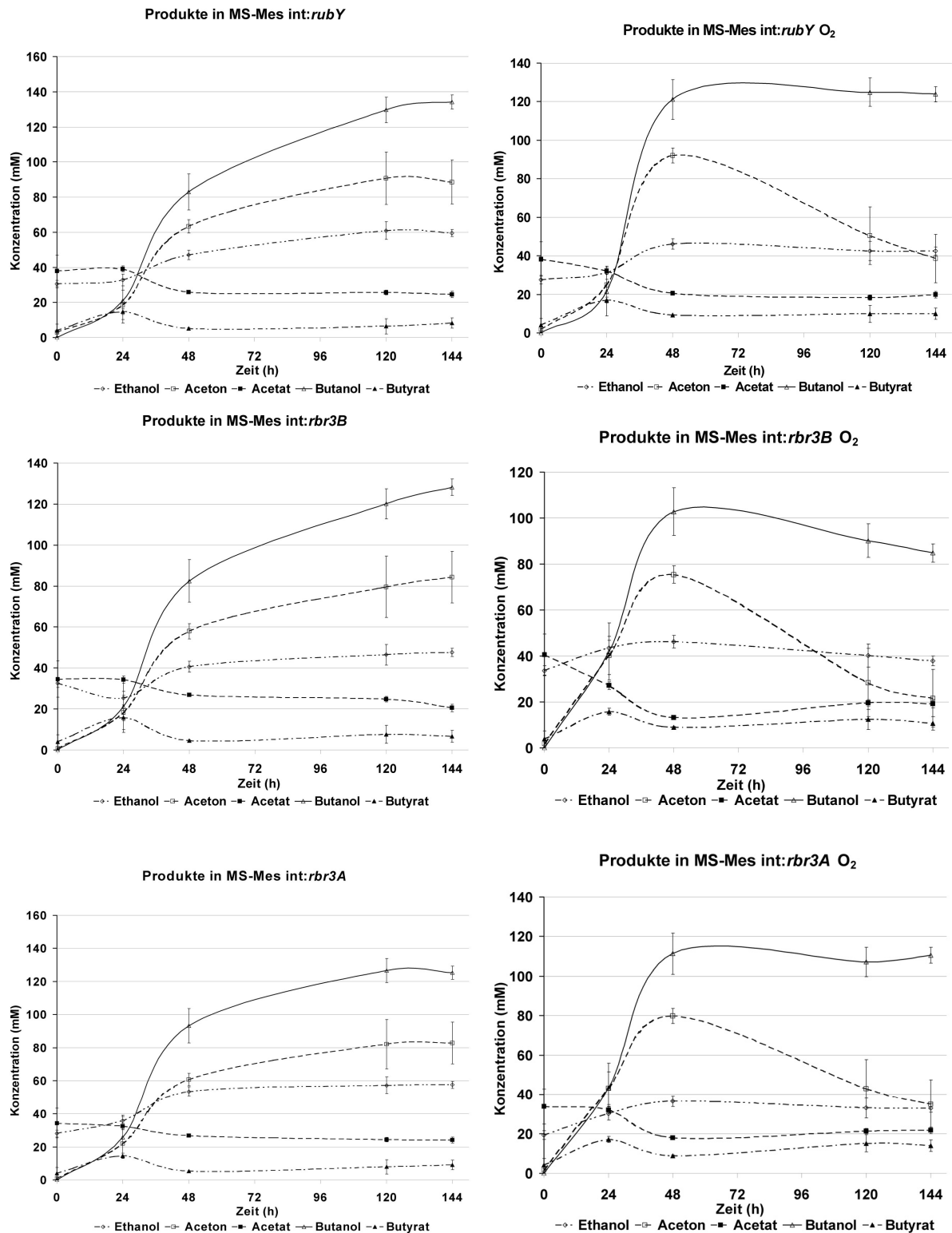
Produkte in MS-Mes pTnrr O<sub>2</sub>

Produkte in MS-Mes int:rd

Produkte in MS-Mes int:rd O<sub>2</sub>

Produkte in MS-Mes int:dfx

Produkte in MS-Mes int:dfx O<sub>2</sub>



**Abb. A4: Produktspektren verschiedener *C. acetobutylicum* Stämme in MS-Mes-Medium mit und ohne Applikation von O<sub>2</sub>**

Die Kulturen wurden in Hungates mit MS-Mes (10 ml) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 angezogen und anschließend mit oder ohne Aerobisierung weiter inkubiert. Die Probenahmen erfolgten über einen Zeitraum von 7 Tagen. Die Konzentrationen von Säuren und Lösungsmitteln wurden gaschromatographisch bestimmt (2.7.2).



## Danksagung

Herrn **Prof. Dr. Hubert Bahl** danke ich für die Überlassung des Themas und das Ermöglichen einer selbständigen wissenschaftlichen Arbeit.

Herrn **Dr. Ralf-Jörg Fischer** danke ich für die zahlreichen konstruktiven Unterhaltungen und Diskussionen, die ständige Gesprächsbereitschaft sowie die kritischen und aufmunternden Worte.

**Falk Hillmann** danke ich für den ständigen konstruktiven Gedankenaustausch und so manches Späßchen.

Den Mitarbeitern der Abteilung Mikrobiologie der Universität Rostock, insbesondere **Ilena Boldt, Monika Timm, Antje May, Mandy Zechlau, Holger Janssen, Michael Scheel** und **Miriam Mann** gilt mein besonderer Dank für ihre Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit und die schöne Zeit.

Besonderer Dank gilt Herrn **Dr. Tomas Fiedler** und Frau **Dr. Tina Lütke-Eversloh** für das Korrekturlesen dieser Arbeit sowie ihre häufig nützlichen Tipps im Laboralltag.

Der **Landesgraduiertenförderung Mecklenburg-Vorpommern** danke ich für die finanzielle Förderung dieser Promotion.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern **Gabriela** und **Willi Riebe** für die große moralische und finanzielle Unterstützung.

Mein größter Dank gilt meiner Ehefrau **Marion Riebe** für ihren unerschütterlichen Glauben an mich und die vielen aufbauenden Worte an Tagen, an denen mal wieder nichts klappte. Ihre Liebe und ihr Vertrauen in mich haben mir immer wieder Kraft gegeben.

Allen nicht genannten, die in irgendeiner Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, sei an dieser Stelle gedankt.

## Publikationsliste

### Veröffentlichungen in Fachzeitschriften:

**May A, Hillmann F, Riebe O, Fischer RJ, Bahl H.** 2004. A rubrerythrin-like oxidative stress protein of *Clostridium acetobutylicum* is encoded by a duplicated gene and identical to the heat shock protein Hsp21. *FEMS Microbiology Letters* **238**: 249 – 254.

**Riebe O, Fischer R-J, Bahl H.** 2007. Desulfoferrodoxin from *Clostridium acetobutylicum* functions as a superoxide reductase. *FEBS Lett.* **581**: 5605 - 5610.

**Riebe O, Fischer R-J, Wampler D A, Kurtz D M Jr, Bahl H.** 2009. Pathway for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> detoxification in *Clostridium acetobutylicum*. *Microbiology.* **155**: 16 – 24.

**Hillmann F, Riebe O, Fischer R-J, Mot A, Caranto J D, Kurtz D M Jr, Bahl H.** 2009. Reductive dioxygen scavenging by flavo-diiron proteins of *Clostridium acetobutylicum*. *FEBS Lett.* **583**: 241 - 245.

**Hillmann F, Riebe O, Bahl H.** 2009. An die Luft gesetzt – die O<sub>2</sub>-Entgiftung eines obligaten Anaerobiers. *BIOspektrum.* **3/2009**: 252 – 254.

### Tagungsbeiträge (Poster/Vorträge):

**May A, Hillmann F, Riebe O, Fischer R-J, Hubert Bahl.** 2004. A rubrerythrin-like protein of *Clostridium acetobutylicum* encoded by a duplicated gene is identical with the heat shock protein Hsp21. **Poster** auf der Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) in Braunschweig.

**Riebe O, Hillmann F, Fischer R-J, Bahl H.** 2005. Oxidative stress response of *Clostridium acetobutylicum*. **Poster** auf der Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) in Göttingen.

**Riebe O, Fischer R-J, Bahl H.** 2006. Desulfoferrodoxin: A superoxide-reductase of *Clostridium acetobutylicum* involved in ROS-detoxification. **Poster** auf der Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) in Jena.

**Riebe O, Fischer R-J, Bahl H.** 2007. *Clostridium acetobutylicum* desulfoferrodoxin functions as a superoxide reductase. **Poster** auf der Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) in Osnabrück.

**Riebe O, Fischer R-J.** 2008. Reverse rubrerythrin: a new multifunctional defence protein against reactive oxygen species in *Clostridium acetobutylicum*. **Vortrag** auf der Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) in Frankfurt am Main.

**Mann M, Riebe O, Hillmann F, Bahl H.** 2009. Microoxic growth and metabolism of *Clostridium acetobutylicum*. **Vortrag** auf der Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) in Bochum.

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Rostock, 29. 01. 2009

Oliver Riebe